

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JHULIA GELAIN

**FISIOLOGIA, COMPONENTES DO MONOCICLO DA PODRIDÃO DE *Neonectria*
ditissima EM FRUTOS E SOBREVIVÊNCIA DE PATÓGENOS EM RAMOS DE
MACIEIRA**

CURITIBA

2017

JHULIA GELAIN

**FISIOLOGIA, COMPONENTES DO MONOCICLO DA PODRIDÃO DE *Neonectria*
ditissima EM FRUTOS E SOBREVIVÊNCIA DE PATÓGENOS EM RAMOS DE
MACIEIRA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Profa. Dra. Louise Larissa May De Mio

Coorientador: Dr. Silvio André Meirelles Alves

CURITIBA

2017

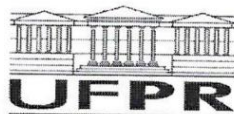
G314 Gelain, Jhulia

Fisiologia, componentes do monociclo da podridão de *Neonectria ditissima* em frutos e sobrevivência de patógenos em ramos de macieira / Jhulia Gelain. Curitiba: 2017. 97 f.; il.

Orientadora: Louise Larissa May De Mio
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná.
Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em
Agronomia – Produção Vegetal.

1. Maçã. 2. Maçã – Doenças e pragas. 3. Fitopatologia.
I. May De Mio, Louise Larissa. II. Universidade Federal do Paraná.
Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós – Graduação em
Agronomia – Produção Vegetal. III. Título.

CDU 634.11



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor CIÊNCIAS AGRÁRIAS
Programa de Pós-Graduação AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL)


TERMO DE APROVAÇÃO


Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **JHULIA GELAIN** intitulada: **FISIOLOGIA, COMPONENTES DO MONOCICLO DA PODRIDÃO DE *Neonectria ditissima* EM FRUTOS E SOBREVIVÊNCIA DE PATÓGENOS EM RAMOS DE MACIEIRA**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO.

Curitiba, 31 de Março de 2017.


LOUISE LARISSA MAY DE MIO

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)


NATASHA AKEMI HAMADA
Avaliador Externo (UFPR)


WAGNER VICENTE PEREIRA
Avaliador Externo (UFPR)


SILVIO ANDRE MIRELLES ALVES
Avaliador Externo (EMBRAPA)

À minha mãe,
Marilene Gelain,
dedico.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Marilene Gelain, que sempre me incentivou e motivou nos estudos, e pelo caráter no qual procuro me espelhar. À minha família, pelo carinho e por me mostrarem o quão gratificante é o trabalho no campo.

À orientadora profa. Dra. Louise Larissa May De Mio, por me trazer ao mundo da pesquisa, pelos preciosos conhecimentos transmitidos e por depositar sua confiança em mim e no meu trabalho.

Ao Coorientador Dr. Silvio André Meirelles Alves, pelos ensinamentos, atenção, ajuda, paciência e por ser exemplo de pesquisador; aos demais profissionais da Embrapa Uva e Vinho, que foram de fundamental importância, em especial Claudia Cardoso Nunes e Faustina Verlindo de Lima.

Ao Dr. Marcos Antônio Dolinski e à MSc. Rafaela Regina Moreira pela atenção, paciência, colaboração fundamental com esse trabalho e pela amizade. Não teria conseguido sem vocês.

À prof. Dra. Natasha Akemi Hamada, ao Eng. Agrônomo Ivanir Leopoldo Dalanhol e à Dra. Monika Walters pela ajuda, atenção e disposição.

Ao Renato Suguiy pela força, disposição, atenção, carinho e compreensão.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório, Eliane Rogovski, Marlon Hahn, Pamela Dutra, Camilla Castellar, Heloisa Thomazi, Monica Anghinoni Muller, Giselda Alves, Gloria Vidal, Wagner Vicente e Alexandre Roesse pelo apoio, amizade, companheirismo e pelos valiosos conselhos. Aos estagiários Samuel de Paula e Alex Soares pela ajuda indispensável nos experimentos e pelos momentos de descontração. Aos meus amigos da graduação pela amizade.

Aos professores da Pós Graduação por sua dedicação ao ensino.

À secretária do PGAPV, Sra. Lucimara Antunes, pela disposição e dedicação.

Aos funcionários do departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo pelo auxílio.

A todos os produtores em cujas propriedades realizei coleta de material, na Região Metropolitana de Curitiba e em Palmas.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, colaboraram com a pesquisa e torceram por mim.

“We cannot solve our problems with
the same thinking we used when we
created them.”

(ALBERT EINSTEIN)

RESUMO

A região sul do Brasil se destaca na produção de maçãs (*Malus domestica*). Em 2012, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) confirmou casos de Cancro Europeu (*Neonectria ditissima*, fase imperfeita *Cylindrocarpon heteronema*) nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, e no Paraná foi relatada apenas na região de Palmas. A escassez de informações a respeito do comportamento do patógeno em condições brasileiras, principalmente no que se refere à infecção em frutos, compromete o controle da doença a campo. Além disso, não há na literatura trabalhos a respeito da sobrevivência deste e de outros patógenos em ramos de macieira no período da dormência e após brotação nas áreas comerciais. Tendo isso em vista, este trabalho foi dividido em duas partes. Na primeira parte, foram estudados os efeitos de diferentes temperaturas e períodos de molhamento em processos fisiológicos da fase imperfeita de *Neonectria ditissima in vitro*, e também processos de infecção, colonização e reprodução *ex vivo* em frutos. O patógeno apresentou potencial de germinação, crescimento micelial e esporulação em ampla faixa de temperatura. Para a germinação a melhor temperatura testada foi de 20 °C, e períodos de molhamento superiores a 24 horas foram suficientes para a germinação de 70% dos conídios na faixa de temperatura entre 10 e 30 °C, sendo a temperatura ótima entre 16,6 e 18,4 °C. A produção de microconídios foi maior a 20 °C, enquanto que para a produção de macroconídios as temperaturas de 15 e 20 °C foram as melhores. Isolados coletados em diferentes épocas e/ou locais não apresentam diferenças na agressividade em frutos de macieira cultivar Gala. Apesar de não detectada a presença de *N. ditissima* na região metropolitana de Curitiba, as condições climáticas dessas regiões são tão favoráveis quanto àquelas de regiões do Rio Grande do Sul nas quais já foi observada a doença em frutos. A cultivar Eva não difere da cultivar Gala em relação à suscetibilidade à podridão por *N. ditissima* em frutos. A segunda parte do trabalho avaliou a presença e sobrevivência de patógenos em ramos de macieira como potencial fonte de inóculo após a brotação. Foram detectados os gêneros de fungos patogênicos: *Neonectria* sp., *Colletotrichum* sp., *Botryosphaeria* sp., *Alternaria* sp., *Fusarium* sp. *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. e *Rhizopus* sp. No período após a brotação verificou-se que os tratamentos de inverno reduziram o inóculo dos gêneros *Colletotrichum*, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Rhizopus*, entretanto, foi constatada elevada incidência dos gêneros *Botryosphaeria*, *Alternaria* e *Fusarium*, os quais podem se tornar problema na cultura. O patógeno *N. ditissima* foi detectado nas áreas de Palmas – PR, mesmo após os tratamentos de inverno, sendo potencial fonte de inóculo para a infecção depois da brotação, ao longo do ciclo da macieira. Os patógenos *N. ditissima*, *Colletotrichum* sp., *Botryosphaeria* sp., *Alternaria* sp. e *Fusarium* sp. isolados de ramos de macieira foram patogênicos a frutos de maçã da cultivar Gala. Recomenda-se que sejam estudadas medidas de controle específicas à redução do inóculo primário para minimizar o impacto de epidemias em campo.

Palavras-chave: *Neonectria ditissima*; *Malus domestica*; doença; sobrevivência; ramos.

ABSTRACT

The southern region of Brazil stands out in the production of apples (*Malus domestica*). In 2012, the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply (MAPA) confirmed cases of European Canker (*Neonectria ditissima*, anamorph *Cylindrocarpon heteronema*) in the states of Rio Grande do Sul and Santa Catarina, and in Paraná were reported only in the region of Palmas. The lack of information about the behavior of the pathogen under Brazilian conditions, especially with regard to infection in fruits, compromises the control of the disease in the field. In addition, there is no literature on the survival of this and other pathogens in apple tree twigs in dormancy and bud break in production areas. Therefore, this work was divided into two chapters. In the first chapter, we studied the effects of different temperatures and wetness periods on physiological processes of the imperfect stage of *Neonectria ditissima in vitro*, as well as infection, colonization and reproduction in fruits. The pathogen presented potential of germination, mycelial growth and sporulation in a wide temperature range. For the germination the best temperature tested was 20 °C, and wetness periods of more than 12 hours were sufficient for the germination of 70% of the conidia in the temperature range between 10 and 30 °C. The optimum estimated temperature for the mycelial growth of the isolates varied between 16,6 and 18,42 °C. Production of microconidia was higher at 20 °C, whereas for the production of macroconidia the temperatures of 15 and 20 °C were better. Isolates collected at different times and/or places did not present differences in the aggressiveness on 'Gala' apple fruits. Although the presence of *N. ditissima* is not yet detected in Campo Largo and Porto Amazonas, the climatic conditions of these regions are as favorable as those in regions of Rio Grande do Sul in which the disease in fruits has already been observed. The cultivar Eva does not differ from the cultivar Gala in relation to the susceptibility to fruit rot by *N. ditissima*. The second chapter evaluated the presence and survival of pathogens in apple tree twigs as inoculum potential on bud break. Several pathogenic fungi genera were detected: *Neonectria ditissima*, *Colletotrichum* sp., *Botryosphaeria* sp., *Alternaria* sp., *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. and *Rhizopus* sp. Winter treatments were efficient for reducing the inoculum of the genera *Colletotrichum*, *Aspergillus*, *Penicillium* and *Rhizopus*. It was observed a high incidence of the genera *Botryosphaeria*, *Alternaria* and *Fusarium* in the sprouting period that can become a phytosanitary problem if specific control measures are not directed to the reduction of the primary inoculum. *N. ditissima* was detected in the Palmas - PR areas, even after winter treatments, being a potential source of inoculum for infection during sprouting. The pathogens *N. ditissima*, *Colletotrichum* sp., *Botryosphaeria* sp., *Alternaria* sp. and *Fusarium* sp. isolated from apple tree twigs were pathogenic to 'Gala' apple fruits. Specific control measures for primary inoculum reduction should be studied to minimize the impact of field epidemics.

Key-words: *Neonectria ditissima*; *Malus domestica*; monocycle; disease; survival; twigs.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.	PRODUÇÃO MUNDIAL DE MAÇÃS, POR CONTINENTES (1961-2013).....	17
FIGURA 2.	CURVAS DO DIÂMETRO DA COLÔNIA DE ISOLADOS DA FASE IMPERFEITA DE <i>Neonectria ditissima</i> EM MEIO DE CULTURA BDA, APÓS 20 DIAS DE INCUBAÇÃO EM DIFERENTES TEMPERATURAS, E TEMPERATURAS ÓTIMAS PARA O CRESCIMENTO MICELIAL DE CADA ISOLADO.....	56
FIGURA 3.	MÉDIA DA PRODUÇÃO DE MACROCONÍDIOS (LINHA CONTÍNUA) E MICROCONÍDIOS (LINHA TRACEJADA) DE QUATRO ISOLADOS DA FASE IMPERFEITA DE <i>Neonectria ditissima</i> (FRR01, 32, 18 E EMB) EM DIFERENTES TEMPERATURAS.	56
FIGURA 4.	CURVAS DE INCIDÊNCIA DA DOENÇA EM NUMERO DE FRUTOS (N=10) (a) E PROGRESSO DO DIÂMETRO DE LESÕES (b) CAUSADOS POR DIFERENTES ISOLADOS DA FASE IMPERFEITA DE <i>Neonectria ditissima</i> EM FRUTOS DE MAÇÃ DA CULTIVAR GALA.	59
FIGURA 5.	SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DE GERMINAÇÃO DE CONÍDIOS DA FASE IMPERFEITA DE <i>Neonectria ditissima</i> , EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA E DO PERÍODO DE MOLHAMENTO, PARA O ISOLADO EMB.	60
FIGURA 6.	DISTRIBUIÇÃO DA DENSIDADE (a) E FREQUÊNCIA ACUMULADA RELATIVA (b) PARA O PERÍODO DE INCUBAÇÃO PARA A FASE IMPERFEITA DE <i>Neonectria ditissima</i> EM FRUTOS DE MACIEIRA DA CULTIVAR EVA, PARA AS TEMPERATURAS SIMULADAS DOS DIFERENTES ESTADOS DA REGIÃO SUL, PR= PARANÁ, RS= RIO GRANDE DO SUL E SC= SANTA CATARINA.....	61
FIGURA 7.	DISTRIBUIÇÃO DA DENSIDADE (a) E FREQUÊNCIA ACUMULADA RELATIVA (b) PARA O PERÍODO DE LATÊNCIA PARA A FASE IMPERFEITA DE <i>Neonectria ditissima</i> EM FRUTOS DE MACIEIRA DA CULTIVAR EVA, PARA AS TEMPERATURAS SIMULADAS DOS DIFERENTES ESTADOS DA REGIÃO SUL, PR= PARANÁ, RS= RIO GRANDE DO SUL E SC= SANTA CATARINA.....	62
FIGURA 8.	DISTRIBUIÇÃO DA DENSIDADE (a) E FREQUÊNCIA ACUMULADA RELATIVA (b) PARA O PERÍODO DE INCUBAÇÃO PARA A FASE IMPERFEITA DE <i>Neonectria ditissima</i> EM FRUTOS DE MACIEIRA DAS CULTIVARES EVA E GALA, PARA AS TEMPERATURAS SIMULADAS DOS DIFERENTES ESTADOS DA REGIÃO SUL, PR= PARANÁ, RS= RIO GRANDE DO SUL E SC= SANTA CATARINA.....	63
FIGURA 9.	INCIDÊNCIA DE GÊNEROS DE FUNGOS EM RAMOS DE MACIEIRA 'GALA', TIPO BRINDILAS, COLETADAS NOS PERÍODOS DE DORMÊNCIA E APÓS BROTAÇÃO NOS MUNICÍPIOS DE CAMPO LARGO-PR (A), PORTO AMAZONAS-PR (B), PALMAS-PR 01 (C), PALMAS-PR 02 (D), INCUBADOS EM CÂMARA ÚMIDA. Médias de cada patógeno com a mesma letra não diferem pelo teste de Skott-Knott a 5% de propabilidade (P<0,05). 77	
FIGURA 10.	INCIDÊNCIA DE GÊNEROS DE FUNGOS EM BRINDILAS DE MACIEIRA DA CULTIVAR GALA COLETADAS NO PERÍODO DE DORMÊNCIA NOS MUNICÍPIOS DE CAMPO LARGO-PR (A), PORTO AMAZONAS-PR (B), PALMAS-PR 01 (C) E PALMAS-PR 02 (D), INCUBADOS EM CÂMARA ÚMIDA, COM E SEM TÉCNICA DE INCUBAÇÃO POR OVER NIGHT FREEZING (ONFIT) (15 HORAS A -16 °C). Médias de cada patógeno com a mesma letra não diferem pelo teste de Skott-Knott a 5% de propabilidade (P<0,05).....	79

FIGURA 11. INCIDÊNCIA DE GÊNEROS DE FUNGOS EM BRINDILAS DE MACIEIRA DA CULTIVAR GALA COLETADAS APÓS A BROTAÇÃO NOS MUNICÍPIOS DE CAMPO LARGO-PR (A), PORTO AMAZONAS-PR (B), PALMAS-PR 01 (C) E PALMAS-PR 02 (D), INCUBADOS EM CÂMARA ÚMIDA, COM E SEM TÉCNICA DE INCUBAÇÃO POR OVER NIGHT FREEZING (ONFIT) (15 HORAS A -16 °C). Médias de cada patógeno com a mesma letra não diferem pelo teste Skott-Knot a 5% de propabilidade ($P < 0,05$) 80

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.	DATA DA COLETA, LOCAL DA COLETA, TIPO DE ISOLAMENTO E CÓDIGO DOS ISOLADOS DE <i>Neonectria ditissima</i>	47
TABELA 2.	MÉDIAS DE TEMPERATURA (°C) DA ÉPOCA DE COLHEITA DA MACIEIRA (DEZEMBRO A FEVEREIRO) ENTRE OS ANOS DE 2010 E 2016 PARA OS ESTADOS DO PARANÁ, SANTA CATARINA E RIO GRANDE DO SUL, COM INTERVALOS DISTRIBUÍDOS AO LONGO DO DIA DE ACORDO COM A DISPONIBILIDADE DOS DADOS.....	52
TABELA 3.	DIÂMETRO MÉDIO DE LESÕES 20 DIAS APÓS A INOCULAÇÃO COM DISCO DE BDA COM MICÉLIO DE ISOLADOS DE <i>Neonectria ditissima</i> ORIUNDOS DO MUNICÍPIO DE VACARIA (RS) EM FRUTOS DE MACIEIRA CULTIVAR GALA COM FERIMENTO, MANTIDOS A 23°C EM CÂMARAS DE CRESCIMENTO CONVIRON®.....	54
TABELA 4.	DIÂMETRO DA COLÔNIA DE ISOLADOS DE <i>Neonectria ditissima</i> EM MEIO DE CULTURA BDA, APÓS 20 DIAS DE INCUBAÇÃO EM DIFERENTES TEMPERATURAS.....	55
TABELA 5.	PRODUÇÃO DE MACROCONÍDIOS E MICROCONÍDIOS POR mm ² DE COLÔNIA E RELAÇÃO MICROCONÍDIOS E MACROCONÍDIOS EM DIFERENTES TEMPERATURAS POR ISOLADOS DA FASE IMPERFEITA DE <i>Neonectria ditissima</i> EM PLACAS COM MEIO BDA.	57
TABELA 6.	ÁREA ABAIXO DA CURVA DE PROGRESSO DO DIÂMETRO DE LESÕES (AACPDL) CAUSADAS POR DIFERENTES ISOLADOS DA FASE IMPERFEITA DE <i>Neonectria ditissima</i> INOCULADAS EM FRUTOS DA CULTIVAR GALA (MÉDIA DOS EXPERIMENTOS), PERÍODO DE INCUBAÇÃO (PI) E PERÍODO DE LATÊNCIA (PL) DO EXPERIMENTO 1 (E1) E EXPERIMENTO 2 (E2).	58
TABELA 7.	CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES DE COLETA DOS RAMOS EM RELAÇÃO À LOCALIDADE, CULTIVAR, ESPAÇAMENTO, ANO DE PLANTIO E CULTIVARES POLINIZADORAS.	75

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1	A CULTURA DA MACIEIRA	16
2.1.1	Origem e classificação botânica	16
2.1.2	A cultura da macieira no mundo	16
2.1.3	A cultura da macieira no Brasil	17
2.2	CANCRO EUROPEU DA MACIEIRA E PODRIDÃO DE FRUTOS POR <i>Neonectria ditissima</i>	19
2.2.1	Distribuição	19
2.2.2	Etiologia	19
2.2.3	Sintomatologia	21
2.2.4	Ciclo biológico e epidemiologia	23
2.2.5	Hospedeiros alternativos	26
2.2.6	Controle	27
2.3	PRINCIPAIS PATÓGENOS QUE SOBREVIVEM EM RAMOS DE MACIEIRA	28
2.3.1	<i>Glomerella</i> spp. (<i>Colletotrichum</i> spp.)	29
2.3.2	<i>Botryosphaeria dothidea</i> (<i>Fusicoccum aesculi</i>)	31
2.3.3	<i>Neofabraeae perennans</i> (<i>Cryptosporiopsis perennans</i>)	32
	REFERÊNCIAS	34
3	CAPÍTULO I: ASPECTOS FISIOLÓGICOS DE <i>Neonectria ditissima</i> E COMPONENTES DO MONOCICLO DA DOENÇA EM FRUTOS DE MACIEIRA	44
3.1	INTRODUÇÃO	44
3.2	MATERIAL E MÉTODOS	46
3.2.1	Obtenção dos isolados	46
3.2.2	Agressividade de isolados da fase imperfeita de <i>Neonectria ditissima</i> em frutos da cultivar Gala utilizando disco de micélio	47
3.2.3	Crescimento micelial e esporulação da fase imperfeita de <i>Neonectria ditissima</i> em meio BDA sob diferentes temperaturas	48
3.2.4	Agressividade de isolados da fase imperfeita de <i>Neonectria ditissima</i> em frutos utilizando suspensão de conídios	49
3.2.5	Efeito da temperatura e do período de molhamento na germinação de conídios de <i>Neonectria ditissima</i>	50
3.2.6	Influência da temperatura na infecção da fase imperfeita de <i>Neonectria ditissima</i> em frutos destacados e mantidos em temperaturas simuladas de diferentes estados produtores de maçã	51
3.3	RESULTADOS	53

3.3.1	Agressividade de isolados da fase imperfeita de <i>Neonectria ditissima</i> em frutos da cultivar Gala utilizando disco de micélio	53
3.3.2	Taxa de crescimento micelial e esporulação da fase imperfeita de <i>Neonectria ditissima</i> em meio BDA sob diferentes temperaturas	53
3.3.3	Agressividade de isolados da fase imperfeita de <i>Neonectria ditissima</i> em frutos utilizando suspensão de conídios	58
3.3.4	Efeito da temperatura e do período de molhamento na germinação de conídios da fase imperfeita de <i>Neonectria ditissima</i>	59
3.3.5	Influência da temperatura na infecção da fase imperfeita de <i>Neonectria ditissima</i> em frutos destacados e mantidos em temperaturas simuladas de diferentes estados produtores de maçã.....	60
3.4	DISCUSSÃO	64
3.5	CONCLUSÕES	67
REFERÊNCIAS		68
4 CAPÍTULO II: SOBREVIVÊNCIA DE PATÓGENOS DA DORMÊNCIA ATÉ APÓS A BROTAÇÃO DA MACIEIRA INDICA RISCO POTENCIAL COMO INÓCULO PRIMÁRIO DE DOENÇAS.....		72
4.1	INTRODUÇÃO	72
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	74
4.2.1	Coleta dos ramos	74
4.2.2	Caracterização das áreas de coleta dos ramos	75
4.2.3	Análise estatística.....	75
4.2.4	Teste de patogenicidade em frutos.....	76
4.3	RESULTADOS	76
4.3.1	Presença de patógenos durante a dormência e após brotação em ramos de macieira mantidos em câmara úmida	76
4.3.2	Efeito da Técnica de Incubação por Over Night Freezing (ONFIT) na presença de patógenos em ramos de macieira coletados na dormência e após brotação	78
4.3.3	Teste de patogenicidade dos principais patógenos detectados e isolados de ramos de macieira em frutos da cultivar Gala	80
4.4	DISCUSSÃO	81
4.5	CONCLUSÕES	86
REFERÊNCIAS		87
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....		92
6 APÊNDICES.....		93
APÊNDICE A. PULVERIZAÇÕES REALIZADAS ENTRE JUNHO E SETEMBRO de 2016 NAS PROPRIEDADES DE CAMPO LARGO, PORTO AMAZONAS, PALMAS 01 E PALMAS 02.....		93

APÊNDICE B. CARACTERIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CLIMÁTICAS DAS LOCALIDADES DE CAMPO LARGO-PR E PORTO AMAZONAS-PR OBTIDAS DA ESTAÇÃO METEOROLÓGICA DO IAPAR (INSTITUTO AGRONÔMICO NO PARANÁ) LOCALIZADA NO MUNICÍPIO DA LAPA-PR, DOS MESES DE JUNHO, JULHO E AGOSTO DE 2016.....	94
APÊNDICE C. CARACTERIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CLIMÁTICAS DAS LOCALIDADES DE PALMAS 01 E 02 OBTIDA NA ESTAÇÃO METEOROLÓGICA DE PALMAS-PR DO IAPAR (INSTITUTO AGRONÔMICO NO PARANÁ), DOS MESES DE JUNHO, JULHO E AGOSTO DE 2016.....	95
APÊNDICE D. SINTOMAS EM FRUTOS NO TESTE DE PATOGENICIDADE DE ISOLADOS DE <i>Neonectria ditissima</i> , <i>Colletotrichum</i> sp., <i>Botryosphaeria</i> sp., <i>Alternaria</i> sp. e <i>Fusarium</i> sp. DE RAMOS.....	96

1 INTRODUÇÃO GERAL

A macieira (*Malus domestica* Borkh.) está entre as espécies frutíferas de clima temperado de maior importância econômica no Brasil. A China se destaca como maior produtor mundial, correspondendo a 56% da produção (FAO, 2017). No cenário nacional, a produção de maçã está concentrada nos três estados do sul do Brasil, sendo que Santa Catarina e Rio Grande do Sul responderam por mais de 95% da produção nacional, enquanto o estado do Paraná ocupa a terceira posição, com 4% da produção nacional 2001 e 2010 (IBGE, 2012).

As principais cidades produtoras no Paraná são Palmas, Lapa, Porto Amazonas e Campo do Tenente. Dentre as cultivares plantadas no estado destacam-se Gala, Fuji e Eva, sendo esta última adaptada a regiões com pouco acúmulo de frio (PETRI et al., 2011), e consequentemente um das mais plantadas no estado do Paraná.

Os problemas fitossanitários são considerados grandes limitações para a cultura da macieira. Dentre estes, destacam-se a Mancha Foliar de *Glomerella* e Podridão Amarga (*Glomerella* spp. fase imperfeita *Colletotrichum* spp.), Cancro Papel e Podridão Branca (*Botryosphaeria dothidea* fase imperfeita *Fusicoccum aesculi*); Cancro de ramos e Podridão Olho-de-Boi (*Neofabraea perennans* fase imperfeita *Cryptosporiopsis perennans*); e Cancro Europeu e Podridão de frutos (*Neonectria ditissima* fase imperfeita *Cylindrocarpon heteronema*). Estes patógenos podem infectar diferentes órgãos da planta, podendo ter sua fase de sobrevivência nos ramos da própria planta, mesmo após passar por condições ambientais desfavoráveis como aquelas que ocorrem durante a dormência da macieira e tratamentos de inverno, sendo fonte de inóculo para infecções ao longo do ciclo da cultura. Informações a respeito da sobrevivência de patógenos em ramos de macieira são escassas na literatura.

O Cancro Europeu das Pomáceas e Podridão de frutos causados por *Neonectria ditissima* ocorre em regiões produtoras de maçãs do mundo todo, como Europa, América do Norte, Chile, Austrália, Nova Zelândia, Japão e África do Sul (BERESFORD; KIM, 2011). Detectada no Brasil, em 2002, se destaca entre as doenças que vêm causando grandes perdas na cadeia produtiva da macieira. A doença afeta os ramos, os galhos e o tronco principal da planta. Os frutos de maçã

também podem ser afetados, o que pode resultar em perdas significativas em certas estações (BERRIE, 1989). Apesar da importância do patógeno na cultura, este patossistema ainda é pouco estudado no Brasil, principalmente em se tratando da podridão de frutos.

Este trabalho foi dividido em duas partes. Na primeira parte, foram estudados os efeitos de diferentes temperaturas e períodos de molhamento em processos fisiológicos de *Neonectria ditissima in vitro*, e também processos de infecção, colonização e reprodução *ex vivo* em frutos. A segunda parte do trabalho avaliou a presença e sobrevivência de patógenos em ramos de macieira como potencial de inóculo após a brotação, no início da dormência e após os tratamentos de inverno, em ramos tipo brindilas de macieira da cultivar Gala coletados de diferentes regiões produtoras do estado do Paraná, com e sem utilização da Técnica de Incubação por Over Night Freezing (ONFIT).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A CULTURA DA MACIEIRA

2.1.1 Origem e classificação botânica

A macieira (*Malus domestica* Borkh) pertence à família Rosaceae, subfamília Pomoideae e gênero *Malus*. Ela é possivelmente originária da região entre o Cáucaso e o leste da China, uma vez que sua origem exata não é conhecida (BLEICHER, 2002).

A macieira cultivada é uma frutífera lenhosa, decídua, de clima temperado, muito adaptável a diferentes climas, desde trópicos a altas latitudes. Todos os brotos têm origem nas gemas, que podem estar dispostas ao longo dos ramos longos (maiores que 20 cm) ou ramos curtos, brindilas (entre 5 e 20 cm) e esporões (até 5 cm). Quanto à posição, estes podem ser apicais, na ponta dos ramos, ou laterais, na axila da folha. As flores se dispõem em inflorescências hermafroditas, com reprodução predominantemente alógama, onde ocorre fecundação cruzada entre plantas diferentes. A autoincompatibilidade faz com que seja necessária a polinização cruzada, a qual é realizada por insetos. Devido a estas características, pomares comerciais devem conter uma proporção de cultivar polinizadora, além da presença de insetos vetores de pólen para garantirem a produção de frutos. O fruto é um pomo variável em tamanho, coloração da epiderme, forma, textura e sabor da polpa (PETRI et al., 2006).

2.1.2 A cultura da macieira no mundo

A estrutura econômica da produção macieira em nível mundial é caracterizada pela presença de um grande produtor, representado pela China, que é o maior país produtor da fruta desde meados dos anos 1980. De acordo com o

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA (BRASIL, 2013), a produção mundial de maçãs em 2012/13 correspondeu a 67,8 milhões de toneladas métricas. Desse total, a produção chinesa correspondeu a 56% da produção mundial (FAO, 2017). A FIGURA 1 ilustra a produção mundial de maçãs, por continentes, da década de 1960 até o ano de 2013. Os países europeus se destacaram pela produção de maçã até meados da década 1980, quando os asiáticos passaram a ser os maiores produtores mundiais da fruta.

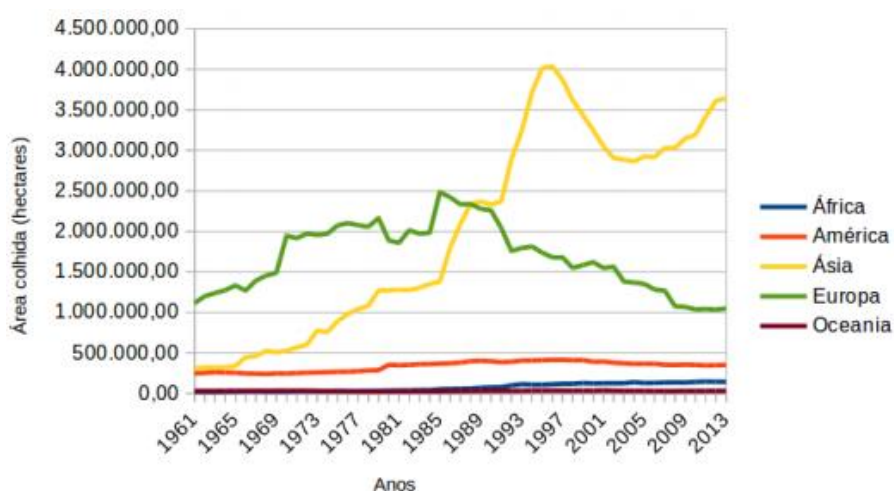


FIGURA 1. PRODUÇÃO MUNDIAL DE MAÇÃS, POR CONTINENTES (1961-2013).

2.1.3 A cultura da macieira no Brasil

O Brasil manteve-se como exportador líquido de maçã nos anos 2000, exceto em 2001 e 2006. Essa posição foi mantida, apesar da quantidade exportada não ser muito expressiva: entre 2001 e 2009, menos de 10% da produção foi exportada (aproximadamente 1,2 milhões de toneladas). O mercado europeu é o principal destino das exportações brasileiras de maçã, 36% das quais foram para a Holanda em 2009. Grande parte da importação brasileira é oriunda de países da América Latina, principalmente a Argentina, que em 2009 respondeu por 82% do total importado pelo país (FAO, 2017).

No Brasil, a maçã passou a ser cultivada no século XX. Até meados dos anos 1960 a produção mantinha-se em níveis relativamente baixos, sendo o país um importador da fruta ao longo desse período. Tal cenário se modificou no fim dos

anos 1970, onde a produção de maçãs passou a crescer de forma gradativa (IBGE, 2012). Até a década de 1970, o Brasil era fundamentalmente abastecido pela produção argentina; nos últimos anos, porém, o país diminuiu as importações de maçãs e, além de alcançar a autossuficiência, passou também a exportar. Nos anos 2000 a produção continuou a se expandir, ainda que de forma não regular ao longo do período.

A produção de maçã no Brasil concentra-se nos estados da região sul, principalmente em Santa Catarina e Rio Grande do Sul; esses dois estados foram responsáveis, entre 2001 e 2010, por mais de 95% da produção de maçã do país, sendo 54,6% oriunda de Santa Catarina e 41,0% do Rio Grande do Sul. O Paraná respondeu por 4,0% da produção de maçã entre 2001 e 2010, enquanto São Paulo, Minas Gerais e Bahia foram responsáveis por apenas 0,3% do total nacional (IBGE, 2012). A região sul é a maior produtora por possuir as melhores condições para o cultivo de macieira devido à quantidade de horas-frio que é considerada suficiente para atender às necessidades exigidas pela planta, proporcionando condições para se alcançar uma produtividade competitiva e melhor qualidade do fruto.

O estado do Paraná iniciou sua produção comercial a partir da década de 1970, possuindo atualmente quatro regiões com expressão econômica: Palmas, Lapa, Porto Amazonas e Campo do Tenente, que contribuem para a produção do Estado com 53,2%, 19,3%, 8,8% e 8,2%, respectivamente (PETRI et al., 2011).

As cultivares Gala e Fuji e seus respectivos clones (ex: Royal Gala, Fuji Suprema), apresentam as características agronômicas desejáveis para as exigências de mercado, tais como coloração, tamanho, exigência em frio (BONETI et al., 2006) e atualmente representam 14,89% e 7,20% da produção mundial, respectivamente. No Brasil, os grupos Gala e Fuji (e seus clones como Royal Gala, Imperial Gala, Maxi Gala, Brookfield, Fuji Suprema) representam em torno de 60% e 30% da produção, respectivamente. Para as regiões com pouco frio, destaca-se a cultivar Eva, que é comercializada nos meses de dezembro e janeiro (PETRI et al., 2011).

Os frutos produzidos são disponibilizados no mercado consumidor durante o ano todo, devido ao emprego de métodos de conservação como o armazenamento refrigerado e a atmosfera controlada, e outros métodos complementares, que permitem retardar os processos de maturação e senescência (PETRI et al., 2011).

2.2 CANCRO EUROPEU DA MACIEIRA E PODRIDÃO DE FRUTOS POR *Neonectria ditissima*

2.2.1 Distribuição

O Cancro Europeu ocorre em regiões produtoras de maçãs do mundo todo, como Europa, América do Norte, Chile, Austrália, Nova Zelândia, Japão e África do Sul (GROVE, 1990; BERESFORD; KIM, 2011), causando sérios prejuízos em locais e anos de condições climáticas favoráveis. Na Nova Zelândia a doença é favorecida pelas condições climáticas de temperaturas moderadas (15 à 25° C) e precipitações anuais médias superiores a 1000 mm, tornando-se mais difícil, portanto, o controle do Cancro Europeu nos pomares desse país (BERESFORD, 2012).

A infecção de frutos de maçã por *Neonectria ditissima* depende da presença de cancos esporulantes próximos aos frutos e de períodos de molhamento de no mínimo 6 horas de duração (XU; ROBINSON, 2010). Pomares com incidência de cancro em ramos e condições climáticas favoráveis que coincidem com as épocas de florada e colheita estão propensos a ter problemas com podridão pré e pós-colheita. A podridão é relatada como recorrente na Irlanda do Norte (COOKE, 1999), norte da Europa (OGAWA; ENGLISH, 1991; WEBER, 2014) e Inglaterra (BERRIE, 1989).

2.2.2 Etiologia

Baseado em características de sua reprodução assexuada e sexuada, bem como em evidências de estudos filogenéticos moleculares, o fungo causador de Cancro Europeu da macieira pertence a um grupo taxonômico bem definido, possuindo um estado de *Neonectria* perfeito (ascospórico) e um de *Cylindrocarpon* imperfeito (conidial) (CASTLEBURY et al. 2006, CHAVERRI et al., 2011).

Durante os últimos 150 anos, o nome científico desse fungo mudou repetidamente. No século XIX este fungo foi incluído em *Nectria ditissima* Tul. & C.

Tul. que foi originalmente descrito como um agente patogênico de árvores florestais, especialmente de Faia. Em 1901, o fungo causador do Cancro Europeu foi separado de *N. ditissima* e nomeado *Nectria galligena* Bres., modificado em 1995 para *Neonectria galligena* (Bres.) Rossman & Samuels. O ponto de vista atual é que *Neonectria ditissima* e *N. galligena* são congênicas, portanto a denominação *N. ditissima* (Tul. & C. Tul.) Samuels & Rossman tem que ter precedência sobre *N. galligena* (CASTLEBURY ET AL., 2006; ROSSMAN; PALM-HERNÁNDEZ 2008). Independentemente destas considerações, o nome do estado conidial permanece *Cylindrocarpon heteronema* (Berk. & Broome) Wollenw.

Espécies de *Neonectria* caracterizam-se por ter peritécios subglobosos a amplamente obpiriformes, lisos a rugosos, vermelhos, tornando-se vermelho escuro em hidróxido de potássio a 3% (KOH), e com um ápice agudo a constrito. A parede peritecial é de cerca de 50 µm de espessura; os ascósporos são hialinos, geralmente bicelulares, raramente multicelulares, e lisos ou finamente ornamentados (ROSSMAN et al., 1999).

A variação morfológica em *Neonectria* resultou na subdivisão de espécies em cinco grupos informais, principalmente com base em características periteciais, sendo o grupo de *N. ditissima* caracterizado por ter poucos a numerosos peritécios agrupados em madeira; paredes periteciais são de aproximadamente 50 µm de espessura, composta de células pequenas de paredes relativamente espessas; e os ascósporos são geralmente lisos (BOOTH 1959). Já os anamorfos no grupo de *N. ditissima* (clado I em MANTIRI et al., 2001) pertencem ao grupo 1 de *Cylindrocarpon*, que possuem micro e macroconídios mas não formam clamidósporos (BOOTH, 1959). Nas estruturas denominadas peritécios estão as ascas que contêm oito ascósporos, que são de forma elipsoidal, oval ou fusiforme, levemente constritos no septo central; são formados por duas células (bicelulares), possuem 14-20 x 5-7 µm de tamanho e são hialinos. Na primavera, são liberados por uma massa gelatinosa que se concentra na superfície do peritécio, principalmente a curtas distâncias (OGAWA e ENGLISH, 1991). Porém, segundo Saure (1961) e Graf (1976), citados por Weber (2014), os ascósporos são de grande importância na epidemia em climas marítimos, porque eles podem ser transportados por centenas de metros ou mesmo alguns quilômetros por correntes de ar.

Dois tipos de conídios são produzidos por *Cylindrocarpon heteronema*, na natureza e em cultura em laboratório (BOOTH, 1966). Os macroconídios são

produzidos em esporodóquios, estruturas de coloração branca a creme; os conidióforos são ramificados e advindos de micélio esbranquiçado. São cilíndricos, retos ou levemente curvos, com extremidades arredondadas, e tamanho médio de 52-62 x 4,5-5,5 µm. Possuem de 1 a 7 septos. Os microconídios são mais curtos, cilíndricos ou elipsoides, hialinos e asseptados ou com um septo. Seu tamanho médio é de 4-8 x 2-3 µm. Como são capazes de germinar de maneira similar aos macroconídios, eles também são vistos, em termos funcionais, como macroconídios unicelulares (WEBER, 2014).

2.2.3 Sintomatologia

Na cultura da macieira, a doença afeta principalmente as partes lenhosas como os ramos do ano, os galhos e o tronco principal da planta. Também pode infectar frutos causando sintoma de podridão, que pode resultar em perdas significativas em certas estações (BERRIE, 1989).

O termo “cancro” refere-se ao sintoma de um ferimento aberto cercado por casca “inchada”. Os cancros podem se formar em diversas plantas lenhosas e podem ser causadas por diversos patógenos. Em espécies de *Malus* e *Prunus* os cancros em tecidos lenhosos podem ser causados por *Neofabraea* sp., *Colletotrichum* sp., *Monilinia fructigena*, *Erwinia amylovora* e *Neonectria ditissima*, dentre outros.

Cancros em ramos mais novos (menos de dois anos de idade) se desenvolvem a partir de infecções que se dão por meio de ferimentos da queda de folhas, abertura de gemas ou outros ferimentos (SWINBURNE, 1975). Esses cancros em ramos mais jovens tendem a restringir os vasos do sistema vascular, principalmente em cultivares suscetíveis, causando a morte do ramo. Os cancros inicialmente são pequenos, circulares com áreas marrons. Com o tempo, a área central torna-se afundada e mais escurecida e, nas margens, o tecido fica mais elevado sobre a casca sadia. O crescimento do cancro é lento e a planta reage formando um tecido em volta do cancro (calo) (ALVES, 2014).

Ao longo dos anos, o fungo invade mais tecido sadio ao redor do cancro; em consequência desse crescimento descontínuo, há formação do sintoma parecido

com um alvo (ALVES, 2014); cancrios em ramos velhos (mais de dois anos de idade) ou principais causados por *N. ditissima* tem formato de “concha de ostra”, e se expandem mais rapidamente em sentido longitudinal do que transversal do ramo ou tronco (SWINBURNE, 1975).

Os danos são maiores em plantas jovens porque o fungo agride o caule ou ramos principais, enquanto em plantas mais velhas os ramos menores são mais infectados. Independente da idade da planta, quando esta é afetada no caule, seu vigor e produção ficam prejudicados, além de ficar suscetível à quebra pelo vento (ALVES, 2015).

N. ditissima também pode causar perdas severas em frutos de maçã (SWINBURNE, 1971, 1974; SCHIEWE, MENDGEN, 1992), sendo um sério problema na Irlanda do Norte (COOKE, 1999), norte da Europa (OGAWA & ENGLISH, 1991) e Inglaterra (BERRIE, 1989), sendo que levantamentos de podridões pós-colheita de maçãs no Sudeste da Inglaterra mostraram que a incidência de podridão por *Neonectria* nos frutos armazenados variou de 0,2 a 4,2% para cv. Cox's Orange Pippin (BERRIE, 1989).

O patógeno infecta frutos de maçã resultando em podridão em pré-colheita (no pomar) ou, mais comumente, em pós-colheita (armazenamento) (XU; ROBSON, 2010). A rota de infecção é na terminação do cálice (principalmente em variedades com cálice aberto), lenticelas, lesões de sarna e ferimentos.

Infecções na floração geralmente levam a uma lesão no receptáculo floral do fruto em desenvolvimento. As lesões tipicamente tornam-se visíveis no início do verão, quando o fruto atinge metade de seu tamanho máximo e continuam a se expandir lentamente na superfície e também em direção à parte mais interna do fruto. Uma vez que o micélio atinge o centro, podem ser induzidos sintomas de amadurecimento prematuro do fruto, tal como superfície cerosa ou pigmentação brilhante dos frutos. Em casos raros, a infecção é iniciada no centro do fruto jovem (podridão carpelar), caso em que não são visíveis sintomas exteriores além de uma indução prematura da maturação do fruto (WEBER, 2010).

Um segundo tipo de podridão de frutos causado por *N. ditissima* torna-se evidente na colheita ou, mais comumente, após armazenamento em longo prazo. Como essas lesões são devido a infecções por ferimentos ou lenticelas, podem aparecer em qualquer lugar na maçã. Uma característica da doença é que o tecido infectado pode ser facilmente separado do tecido saudável, usando uma espátula ou

uma colher. Estas podridões pós-colheita são normalmente iniciadas dentro de 2-4 semanas antes da colheita quando o fruto gradualmente se torna mais suscetível a infecções fúngicas (XU; ROBINSON, 2010). Na colheita, o declínio gradual da capacidade das frutas para produzir ácido benzóico, que tem sido identificado como um importante metabólito antifúngico de frutos em crescimento, e se correlaciona com a crescente suscetibilidade dos frutos a *N. ditissima* e outros patógenos pós-colheita (BROWN E SWINBURNE, 1971; SENG et al., 1985).

As podridões são do tipo mole, levemente abauladas, normalmente circulares, marrons e com os centros marrom-claros, mas a cor depende da cultivar e das condições de armazenamento dos frutos; em condições de baixa concentração de oxigênio as lesões tendem a ser esverdeadas e com pouca esporulação, enquanto em armazenamento em concentrações maiores de oxigênio tendem a ser amarronzadas e com pústulas esporulantes brancas a creme (SWINBURNE, 1975).

2.2.4 Ciclo biológico e epidemiologia

No inverno, o patógeno sobrevive nos pomares na forma de micélio e peritécios em ramos, galhos ou outros tecidos doentes. Com molhamento constante, o micélio (*C. heteronema*) cresce pelas células do córtex, desprendendo a casca (ZELLER, 1926; OGAWA e ENGLISH, 1991).

Depois do inverno e em condições de elevada umidade ocorre a esporulação, sendo produzidos os dois tipos distintos de esporos: os conídios, assexuais, produzidos em esporodóquios em cancrios recém-formados ou novos e dispersos da primavera até o outono, e os ascósporos, sexuais, produzidos em peritécios em cancrios com 1-2 anos de idade ou mais, expelidos durante períodos chuvosos na primavera e outono. Entrando em contato com ferimentos ou infectando flores e frutos, os dois tipos de esporos iniciam novo processo de infecção, colonização e reprodução, reiniciando o ciclo.

Tanto macroconídios como microconídios são principalmente dispersos passivamente por respingos de chuva (WEBER, 2014), enquanto a dispersão pelo vento também pode ocorrer em regiões com baixa pluviosidade (SWINBURNE, 1971).

Os ascósporos que são produzidos em ascas são normalmente expelidos ativamente pelo ostíolo peritecial e disseminados pelo vento. Peritécios maduros produzem agregações de ascósporos no ostíolo peritecial como uma massa esbranquiçada, especialmente se forem mantidos por alguns dias em condições de calor e umidade, sendo dispersos por respingos de chuva (WEBER, 2014).

De acordo com Latorre et al. (2002), temperaturas entre 5 e 32 °C são adequadas para a germinação de conídios de *N. ditissima*, sendo 15 °C a temperatura ótima para infecção em ferimentos de quedas de folhas e não havendo infecção a temperaturas inferiores a 5 °C. Em trabalho de identificação de condições climáticas regionais favoráveis ao desenvolvimento de Cancro Europeu, Beresford e Kim (2011) confirmaram o que Dubin e English (1975) haviam proposto a respeito da faixa ótima de temperatura para a germinação de conídios, que fica entre 11 e 16 °C. Com relação à pluviosidade, sua frequência e duração são relatadas como fatores de maior importância no desenvolvimento de Cancro do que o total acumulado (DUBIN; ENGLISH, 1975). A presença de umidade superficial nas folhas de macieira também é fator relevante (XU et al., 1998). Como demonstrado por Beresford e Kim (2011), regiões produtoras nas quais esse intervalo de temperatura ideal (11 a 16°C) ocorre durante 8 horas ou mais do dia e que apresentam chuvas em 30% ou mais dos dias do mês durante vários meses apresentam problemas com o Cancro Europeu.

Locais sabidamente problemáticos quanto à doença possuem temperaturas e pluviosidade ideais no período de queda das folhas no outono, tido como uma das mais importantes vias de entrada do fungo e cujo período de suscetibilidade, que é o tempo que a planta demora para realizar a cicatrização, varia de 1 a 28 dias (DUBIN; ENGLISH, 1974).

Os ferimentos de poda foram considerados por Amponsah et al. (2015) como os que tornam a planta mais suscetível e com maior número de incidência de lesões após inoculação artificial, embora o monitoramento em pomares comerciais tenha demonstrado menor importância desse tipo de ferimento devido à utilização de pastas de poda e fungicidas após a poda. Com o passar do tempo ocorre a cicatrização dos ferimentos, deixando as plantas menos suscetíveis à infecção. Este processo depende da atividade fisiológica da planta e da temperatura, ambas maiores durante o período vegetativo do que no inverno (ZELLER, 1926). Assim, plantas com ferimentos de poda criados durante o período vegetativo mostram um

declínio na suscetibilidade à infecção por *N. ditissima* aos sete dias, enquanto os ferimentos causados no inverno deixam as plantas suscetíveis à infecção durante várias semanas (XU et al., 1998).

Como os ferimentos de poda podem ser protegidos pela utilização de pastas com fungicidas em pomares comerciais, os ferimentos de colheita foram consideradas por Amponsah et al. (2015) como os mais importantes locais de entrada para *N. ditissima* em inoculação artificial e em infecções naturais. Esses ferimentos foram maiores e as plantas tornaram-se mais suscetíveis que a queda diária de folhas durante o período do outono. A proteção desse tipo de ferimento com fungicidas é difícil porque a colheita dos frutos é feita ao longo do tempo, expondo também os trabalhadores ao fungicida durante a colheita (AMPONSAH et al., 2015).

Ferimentos associados com o crescimento da planta são locais de infecção principalmente no verão (SWINBURNE, 1971). De acordo com Beresford e Kim (2011), locais com verões quentes e secos possuem menor risco se comparados a locais com verões úmidos e temperaturas amenas. Em regiões com verões quentes e secos os ascósporos não são importantes na epidemiologia da doença, e peritécios podem não produzir esporos sexuais maduros (RANSOM, 1997). Em regiões mais áridas dos Estados Unidos e do Chile, raramente são formados peritécios e o inóculo de conídios provavelmente é responsável pela maior parte das infecções (CROWDY, 1952; DUBIN; ENGLISH, 1975).

De acordo com experimento realizado em viveiro, os sintomas causados por *N. ditissima* em partes lenhosas de macieira podem demorar de três meses até três anos para aparecerem (McCRACKEN et al., 2003). O período de incubação pode ser influenciado pelas condições climáticas e pela genética do hospedeiro. Durante a colonização, o fungo tenta avançar em crescimento no tecido vegetal e, por outro lado, a planta tenta impedir esse avanço, de acordo com seus mecanismos de resistência. O resultado disso é a formação de lesões de diferentes tamanhos (GARKAVA-GUSTAVSSON et al., 2011). Embora haja avanço do fungo nos tecidos internos que vão além do sintoma externo, não há evidências de colonização sistêmica (WEBER, 2014).

Ghasemkhani (2015), em estudo comparativo da colonização de *N. ditissima* entre a cultivar suscetível 'Cox's Orange Pippin' e a cultivar parcialmente resistente 'Santana', observou maior número de hifas nas células do parênquima do córtex da

cultivar suscetível em comparação com a cultivar parcialmente resistente, e estas células estavam completamente colapsadas na cultivar suscetível. Esses resultados também foram observados em outros estudos sobre infecções por *N. ditissima* em macieira (CROWDY, 1949) e em freixo (*Fraxinus* spp.) (SAKAMOTO et al., 2004). Uma massa emaranhada de hifas fúngicas foi observada por Ghasemkhani (2015) sob a periderme de ambas as cultivares em 110 dias após a inoculação, o que pode ser o primeiro passo para a produção de esporodóquios.

A podridão de frutos causados por *N. ditissima* ocorre em locais com temperaturas amenas e alta umidade no verão, sendo de comum ocorrência em áreas produtoras localizadas em altas latitudes (>50°) (BERESFORD; KIM, 2011). Xu et al. (1998) sugerem que a suscetibilidade de maçã a *N. ditissima* é baixa inicialmente, e aumenta com a maturidade do fruto. Os frutos são mais suscetíveis à infecção até 4 semanas após a polinização e mais resistentes à infecção quando atingem cerca de 2 meses de idade, tornando-se mais suscetíveis novamente quanto mais maduro o fruto. Segundo Swinburne (1971), os conídios de *N. ditissima* provavelmente entram em frutos de maçã apenas por lenticelas; no entanto, segundo Xu et al. (1998), lenticelas podem não ter se formado ainda nos frutos jovens no momento da inoculação precoce, sugerindo outros locais de entrada para conídios. Um possível tipo de local de entrada é através dos estômatos, uma vez que estes são formados muito cedo no desenvolvimento do fruto e mais tarde tornam-se lenticelas (TETLEY, 1930). A infecção de frutos por *N. ditissima* nos pomares é provavelmente restrita ao fruto mais próximo dos cancos de ramos esporulantes, uma vez que os conídios e ascósporos estão disponíveis ao longo do ano, embora sua produção e liberação dependam da precipitação (SWINBURNE, 1975).

2.2.5 Hospedeiros alternativos

Neonectria ditissima tem uma ampla gama de hospedeiros que inclui macieira (*Malus* sp.) e pera (*Pyrus* sp.), bem como numerosas árvores de folhas largas, como as dos gêneros *Alnus*, *Betula*, *Crataegus*, *Fagus*, *Fraxinus*, *Ilex*, *Juglans*, *Populus*, *Quercus*, *Ribes*, *Salix*, *Tilia* e *Ulmus* (FARR et al., 1989).

2.2.6 Controle

A prevenção da entrada e estabelecimento de um patógeno em uma área isenta é feita por meio de medidas quarentenárias, consolidadas em legislações fitossanitárias de órgãos governamentais, nacionais e internacionais (KIMATI et al., 2011), sendo esse o princípio que deve ser primeiramente colocado em prática em áreas nas quais o Cancro Europeu ainda não foi detectado. A Instrução Normativa nº20 de 2013 do MAPA regulamenta a produção de mudas em viveiros com enfoque na prevenção dessa doença, como, por exemplo, no estabelecimento de distância mínima destes viveiros de pomares com registro de *Neonectria ditissima*, pulverizações obrigatoriamente mensais com fungicidas protetores alternados com curativos, levantamento da presença do patógeno no período de pré comercialização em 100% das mudas pelo Responsável Técnico do viveiro, destruição de todas as mudas contaminadas em caso de laudo positivo para o patógeno, dentre outras. Além disso, a Instrução Normativa também regulamenta o trânsito de mudas e frutos, que não podem ter sintomas causados por *N. ditissima*.

Segundo Palm (1975), citado por Weber (2014), a poda repetida e completa de cancrios é a base do controle da doença em partes lenhosas. No entanto, o momento de realização dessa poda é controverso, porque por um lado a poda no inverno é prática porque as lesões são facilmente visíveis, e por outro lado, segundo Van der Scheer (1974) e De Jong e Van der Steeg (2012), citados por Weber (2014), os ferimentos de poda causadas no inverno predispõem a planta à suscetibilidade à infecção por períodos mais longos, e há evidências de que isso pode se manifestar no pomar. Portanto, a poda dos cancrios fora da estação de crescimento deve ser restrita a períodos prolongados de tempo firme (sem precipitação) e deve ser realizada bem antes das medidas de poda normais; um fungicida protetor tal como a captana pode ser aplicado imediatamente após a poda (WEBER, 2014).

As medidas de controle da podridão de frutos causada por *N. ditissima* devem ser orientadas na fase inicial do crescimento dos frutos. O risco de podridão aumenta quando há um período úmido desencadeado pela chuva de pelo menos 6 horas de duração, quando os frutos estão próximos a lesões esporulantes. As medidas de controle podem ser direcionadas para reduzir a esporulação, como recomendado no Reino Unido (WEBSTER et al., 2001). Xu et al. (1998) afirma que

para pomares com baixa incidência de cancro, a aplicação de fungicida especificamente para o controle da podridão por *N. ditissima* pode não ser necessária; para pomares com um nível médio de cancos esporulantes, o controle durante o desenvolvimento precoce do fruto é essencial durante os períodos de condições climáticas favoráveis; e para pomares com alta incidência de cancos esporulantes, é necessária uma análise cuidadosa para decidir se, além das medidas de controle precoces, uma aplicação de pré-colheita também é necessária, pois pode resultar em um nível inaceitável de resíduos de fungicidas nos frutos. No entanto, é questionável continuar a produção de maçã em pomares com alta incidência de cancos.

2.3 PRINCIPAIS PATÓGENOS QUE SOBREVIVEM EM RAMOS DE MACIEIRA

A cultura da macieira é acometida por muitas doenças fúngicas, e grande parte dos patógenos causadores de doenças importantes da macieira sobrevive em seus ramos. Dentre essas doenças, estão: Mancha Foliar de Glomerella (MFG) e Podridão Amarga, cuja sobrevivência, tanto da fase perfeita (*Glomerella spp.*) como a da imperfeita (*Colletotrichum spp.*) do fungo ocorre principalmente nos ramos e gemas (JONES; SUTTON, 1996); Podridão branca das maçãs e Cancro de papel das macieiras (*Botryosphaeria dothidea* e *Fusicoccum aesculi*), que sobrevive nos cancos dos ramos e tronco e nos ramos de poda que ficam nas plantas ou no solo (JONES; ALDWINCKLE, 1990); Podridão “Olho de boi” e cancro dos ramos (*Cryptosporiopsis perennans*/*Pezicula malicorticis*) cuja sobrevivência ocorre nas gemas, nos ramos e cancos (GROVE et al., 1992); e o Cancro Europeu da Macieira (*Cylindrocarpon heteronema*/*Neonectria ditissima*), que sobrevive na forma de micélio em ramos e troncos ou em estruturas especializadas denominadas peritécios nos cancos (ZELLER, 1926; OGAWA e ENGLISH, 1991). Além desses patógenos, também podem sobreviver outros gêneros de fungos de menor importância. Nos tópicos posteriores, estão apresentados os principais patógenos que sobrevivem em ramos de macieira, com exceção de *N. ditissima*, fungo ao qual já foi dedicado o item 2.2 dessa revisão bibliográfica.

2.3.1 *Glomerella* spp. (*Colletotrichum* spp.)

Esses patógenos são os agentes causais de duas das mais importantes doenças de verão da macieira: mancha foliar de *Glomerella* e podridão amarga da maçã. Em anos de clima favorável à doença, a MFG tem causado elevadas perdas de produção, que em algumas áreas do Brasil, como no estado de Santa Catarina, excederam a 20% da safra, apesar do elevado número de tratamentos com fungicidas protetores, que aumentam o custo de produção (KATSURAYAMA; BONETI, 2012).

O primeiro agente causal identificado no Brasil causando a mancha foliar de *Glomerella* foi *Glomerella cingulata* (*C. gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc.); posteriormente, *C. acutatum* J. H. Simmonds e uma espécie, até então, não identificada de *Colletotrichum* também foram associadas a essa doença (VALDEBENITO-SANHUEZA et al., 2002). Bragança (2013) identificou também as espécies *C. nympheae* e *C. melonis* (que pertencem ao complexo de espécies *C. acutatum*), *C. fructicola* e *C. siamense* (pertencentes ao complexo de espécies *C. gloeosporioides*) e *C. paranaense* (pertencente ao complexo *C. acutatum*).

Nas folhas, as lesões são inicialmente avermelhadas, sem margens definidas, distribuídas ao acaso no limbo foliar e de tamanho que varia de 1 a 4 mm de diâmetro. As folhas lesionadas geralmente amarelecem e caem (BONETI et al., 2006). No centro das lesões antigas desenvolvem-se pontos escuros, os acérvulos e peritécios, que são os corpos de frutificação do fungo. Nos frutos, segundo Boneti e Katsurayama (1999), as manchas são superficiais, de cor marrom-claro, circulares, de 1 a 3 mm de diâmetro, escurecendo e cicatrizando a seguir, sem evoluir para Podridão Amarga. Nos ramos verdes, também são visíveis sintomas da MFG que surgem como lesões longitudinais, de cor marrom clara, que se tornam corticentas e com borda saliente (KATSURAYAMA e BONETI, 2009).

Este fungo pode sobreviver por meio da produção de peritécios em folhas infectadas caídas no chão (CRUSIUS, 2000), saprofiticamente em cancrs causados por outros patógenos (JONES e SUTTON, 1996) e podem ainda ser encontrados em isolamentos feitos a partir de gemas e ramos sem sintomas visíveis coletados de plantas severamente infectadas no ciclo anterior (KATSURAYAMA e BONETI, 1999; CRUSIUS, 2000).

Três táxons, *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., *C. acutatum* J. H. Simmonds, e *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spauld. & H. Schrenk, estão associados com a doença da podridão amarga da maçã (SUTTON, 1990). Os isolados homotáticos monospóricos de *C. gloeosporioides* de frutos com podridão que produzem facilmente peritécios viáveis são tipicamente designados por *G. cingulata* (SHI et al., 1996) e são comumente chamados de isolados periteciais (STRUBBLE; KEITT, 1950). Em contraste, isolados que não formam peritécios viáveis em cultura tipicamente são designados por *C. gloeosporioides* (SHI et al., 1996). Os isolados de *C. acutatum* testados por González et al. (2006) também não possuíram a capacidade de produzir peritécios em cultura.

Os sintomas podem aparecer ainda no campo, de acordo com o ambiente, ou se manifestar durante o período de armazenamento. Inicialmente, ocorrem pequenas lesões pardas a marrom-claras que, ao atingirem cerca de 2 cm de diâmetro, ficam deprimidas. Em condições de alta umidade, torna-se visível a presença de mucilagem de coloração rósea no centro das lesões, onde se encontram os conídios do patógeno (BLEICHER, 2002).

A infecção pode ocorrer logo após a floração, no início do desenvolvimento do fruto, que se torna mais suscetível à medida que amadurece. O patógeno pode sobreviver nos frutos mumificados, nos cancos e na superfície das plantas (VALDEBENITO-SANHUEZA et al., 2002).

A redução do inóculo inicial é obtida pela remoção e pela destruição de frutos doentes e ramos com cancos, prática que deve continuar durante a primavera. O controle químico tem resultados variáveis, provavelmente porque seu sucesso depende da sensibilidade dos isolados patogênicos dominantes no pomar aos fungicidas (VALDEBENITO-SANHUEZA et al., 2002).

Representantes do gênero *Colletotrichum* apresentam acérvulos em forma de disco achatado, subepidérmico, com espinhos ou setas, conidióforo simples e alongado (BARNETT, HUNTER, 1998), e os conídios podem ser produzidos nestes acérvulos ou em ramificações laterais do micélio (MENEZES, 2006). Os conídios nos acérvulos estão envolvidos por uma matriz gelatinosa que provavelmente protege os conídios da dessecação e aumenta a eficiência de germinação e penetração no tecido do hospedeiro (MENEZES, 2006). A forma e o tamanho dos conídios de *Colletotrichum* podem variar muito entre as espécies. Os conídios de *C. gloeosporioides* são hialinos em forma de bastonetes (BECKER et al., 2000), com

ápices obtusos e bases, às vezes, truncadas, medindo 12-17 μm x 3,5-6 μm , sendo os apressórios formados por essa espécie clavados, ovalados, obovados ou lobados, de coloração castanha e medindo 6-20 μm x 4-12 μm (SUTTON, 1992). A forma teleomórfica (*Glomerella cingulata*) produz ascósporos hialinos, de forma alantóide que medem em média 12-24 μm x 4-6 μm (RIBEIRO, 1997; ROCA et al., 2003).

2.3.2 *Botryosphaeria dothidea* (*Fusicoccum aesculi*)

O fungo ascomiceto *Botryosphaeria dothidea* (Moug.) Ces. & De Not. (*Fusicoccum aesculi* Corda) sin. *B. berengeriana* é o agente causal do cancro papel em ramos de macieira e da podridão branca de maçãs. O fungo é bastante variável no tamanho do estroma, ascas e ascósporos. As ascas medem 80-130 x 14-23 μm , e os ascósporos medem 19-26 μm . Os conídios, formados em picnídios formados na fase imperfeita *Fusicoccum*, medem 23-29 x 6-8 μm .

Em climas mais frios, o cancro de papel causado por *Botryosphaeria* spp. são economicamente mais importantes do que as podridões de frutos. As plantas enfraquecidas por lesões em baixa temperatura e estresse por seca são especialmente suscetíveis a patógenos causadores de cancro, incluindo *Botryosphaeria* spp. (SCHOENEWEISS, 1975; SCHOENEWEISS, 1978; WENE; SCHOENEWEISS, 1980). O cancro papel da macieira é caracterizado por formar pequenos pontos circulares ou "bolhas" que geralmente aparecem nos galhos no período do verão. As manchas aumentam, tornam-se afundadas, e o fungo pode crescer rapidamente através dos tecidos para formar lesões afundadas de coloração escura que se estendem até o câmbio em cultivares de maçã muito suscetíveis. Em condições favoráveis, vários cancros podem fundir-se para restringir até mesmo ramos mais grossos. Em cancros mais velhos, o exterior da casca se desprende, formando o sintoma de "cancro papel", e muitas vezes ocorre exsudação de goma. Os cancros de ramos e tronco cessam de crescer no outono e podem se dividir ao longo das bordas. Picnídios e peritécios, de coloração negra, são formados na superfície das lesões ou debaixo da casca exterior que se desprende. Na primavera seguinte, o cancro pode ficar inativo ou pode retomar o crescimento e produzir

esporos (conídios) periodicamente durante todo o verão. Os conídios servem como a principal fonte de infecção para ramos, tronco e frutos (WEAVER, 1974).

A podridão branca de maçãs é uma das doenças de mais difícil controle, pois, apesar de a infecção ocorrer em frutos jovens, os sintomas tornam-se evidentes à medida que se aproxima a colheita, visto que o patógeno pode infectar frutos imaturos intactos e permanecer na forma quiescente até o início da maturação (JONES & ALDWINCKLE, 1990). Nos anos com verões chuvosos e temperaturas amenas, os danos por podridão branca comprometem a produção de maçãs no Brasil (PETRI, 1998). Nos Estados Unidos da América citam-se perdas importantes causadas pela podridão branca, as quais podem atingir até 100% dos frutos (SHAY & SITTERLY, 1954; BROWN & BRITTON, 1986). Segundo Jones & Aldwinckle (1990), o patógeno sobrevive nos cancrios dos ramos e tronco e, a partir deles na primavera, inicia a liberação de ascósporos e/ou conídios, os quais infectam os frutos em desenvolvimento (SUTTON, 1981; SUTTON & BOYNE, 1983). A penetração é direta, necessitando da presença de água livre; a temperatura ótima para germinação é de 28 a 32° C.

2.3.3 *Neofabreae perennans* (*Cryptosporiopsis perennans*)

A Podridão “Olho-de-boi” em frutos, e o cancro de ramos da macieira, associados à infecção pela fase anamórfica de *Cryptosporiopsis perennans* (Zeller & Childs) Wollenw. (Kienholz, 1939) (teleomorfo *Neofabreae perennans* Kienholz; sin. *Pezicula perennans* (Kienholz) Dugan, R.G. Roberts & G.G)). Grove foram descritas no Brasil em 1996 e atualmente encontram-se disseminadas em todas as regiões produtoras de maçã do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, causando perdas de até 16% na cultivar Fuji (SANHUEZA, 2002).

A forma e tamanho dos conídios de *C. perennans* mostraram pequenas diferenças em estudos realizados desde a identificação deste patógeno. Estudos sob várias condições de desenvolvimento mostraram variações entre 3 a 6µm x 15 a 35µm (ABELN et al., 2000).

Nas macieiras a infecção de *C. perennans* pode produzir cancrios em ramos ou se desenvolver saprofiticamente em restos culturais, permitindo que os esporos

sejam produzidos e disseminados por respingos de chuva diretamente sobre os frutos. Sobre os ramos o patógeno requer ferimentos para poder iniciar o processo de infecção. O fungo sobrevive nos tecidos infectados adjacentes às bordas dos cancos velhos (GROVE et al., 1992).

Em geral, os sintomas surgem em pré e pós-colheita. Os frutos infectados no chão do pomar contribuem para a manutenção do inóculo e sobrevivência do fungo. Nos pomares o fungo sobrevive principalmente nos ramos com cancos. Os conídios do patógeno são formados nos acérvulos na superfície dos cancos e lavados pela chuva e posteriormente disseminados pelo vento. Os ascósporos são produzidos no apotécio nos cancos dos ramos com mais de dois anos, estes são ejetados e transportados pelas correntes de ar (SANHUEZA, 2004). No Brasil não foi ainda relatada a ocorrência da fase perfeita *Neofabreae perennans* (SANHUEZA, 2001).

REFERÊNCIAS

- ABELN, E. C. A.; DE PAGTER, M. A.; VERKLEY, G. J. M. **Phylogeny of *Pezicula*, *Dermae* and *Neofabraea* inferred from partial sequences of the nuclear ribosomal RNA gene cluster.** Mycologia. v. 93, n. 4, p. 685-693. 2000.
- ALVES, S. A. M.; CZERMAINSKI, A. B. C. **Controle do Cancro Europeu das Pomáceas com Base no Novo Ciclo *Neonectria ditissima* – Macieira, nas Condições do Brasil.** Comunicado Técnico. Embrapa, n 178. 2015.
- AMPONSAH, N. T.; WALTER, M.; BERESFORD, R. M.; SCHEPER, R. W. A. **Seasonal wound presence and susceptibility to *Neonectria ditissima* infection in New Zealand apple trees.** N.Z. Plant Prot. 68, 250–256. 2015.
- BERESFORD, R. Epidemiologia. **Anais...** Seminário internacional sobre *Nectria galligena* (Cancro Europeu), Vacaria, 24p. 2012.
- BERESFORD, R. M.; KIM, K. S. **Identification of regional climatic conditions favorable for development of European canker of apple.** Phytopathology 101:135–146. 2011.
- BERRIE, A. M. **Storage rots of apple and pear in South-East England 1980-88: incidence and fungicide resistance.** in: IOBC Bull. 1989/XII/6, Vol. II, Integrated Control of Pome Fruit Diseases. B. K. Gessler, ed. IOBC, Locarno, Switzerland. p. 229-239. 1989.
- BLEICHER, J. Botânica e fisiologia. In: EPAGRI (Ed.) **A Cultura da Macieira.** Florianópolis, Epagri. p. 29-36. 2002.
- BONETI, J. I. S.; CESA, J. D.; PETRI, J. L.; BLEICHER, J. Evolução da cultura da macieira. In: EPAGRI. **A cultura da macieira**, 2 ed. Florianópolis: EPAGRI, p. 37-57. 2006.
- BONETI, J. I. S.; KATSURAYAMA, Y. Doenças da macieira (*Malus domestica* Bork.). In: **Manual de identificação de doenças e pragas da macieira.** Florianópolis: EPAGRI, p. 13-90. 1999.
- BOOTH, C. **Studies of pyrenomycetes.** IV. *Nectria* (part 1). Mycological Papers 73: 1–115. 1959.

BOOTH, C. **The genus *Cylindrocarpon***. Mycol Papers 104:1–56. 1966.

BRAGANÇA, C. A. D. **Molecular characterization of *Colletotrichum* spp. associated with fruits in Brazil**. 69 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - ESALQ/USP, São Paulo. 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, Secretaria de Política Agrícola. **Maçã**. Informativo n. 54, Brasília. 2013.

BROWN II, E.A. & BRITTON, K.O. **Botryosphaeria diseases of apple and peach in the Southern United States**. Plant Disease 70:480- 484. 1986.

BROWN, A.E.; SWINBURNE, T. R. **Benzoic acid: an antifungal compound formed in Bramley's Seedling apple fruits following infection by *Nectria galligena* Bres.** Physiological Plant Pathology 1, 469–75. 1971.

CASTLEBURY, L.A.; ROSSMAN, A.Y.; HYTEN, A.S. **Phylogenetic relationships of *Neonectria/Cylindrocarpon* on *Fagus* in North America**. Can J Bot 84:1417–1433. 2006.

CHAVERRI, P.; SALGADO, C.; HIROOKA, Y.; ROSSMAN, A.Y.; SAMUELS, G.J. **Delimitation of *Neonectria* and *Cylindrocarpon* (*Nectriaceae*, *Hypocreales*, *Ascomycota*) and related genera with *Cylindrocarpon*-like anamorphs**. Stud Mycol 68:57–78. 2011.

COOKE, L. R. **The influence of fungicide sprays on infection of apple cv. Bramley's seedling by *Nectria galligena***. Eur. J. Plant Pathol. 105:783-790. 1999.

CROWDY, S. H. **Observations on apple canker. The infection of leaf scars**. Ann Appl Biol 39:569–580. 1952.

CROWDY, S.H. **Observations on apple canker The anatomy of the stem canker**. Annals of Applied Biology, 36(4), pp. 483-495. 1949.

CRUSIUS, L. U. **Epidemiologia da mancha foliar da macieira**. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Setor de Fitopatologia, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo. 2000.

DE JONG, P. F.; VAN DER STEEG, P. A. H. **Vruchtboomkanker in de vruchtboomkwekerij**. Wageningen: DLO, Rapportnr. 33. 2012.

DUBIN, H. J.; ENGLISH, H. **Factors Affecting Apple Leaf Scar Infection by *Nectria galligena* Conidia.** Phytopathology, v. 64, n. 9, p. 1201. 1974.

FARR, D. C.; BILLS, G. F.; CHAMURIS, G. P.; ROSSMAN, A. Y. **Fungi on plants and plant products in the United States.** APS Press. St. Paul. MN. 1252p. 1989.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. **Faostat:** base de dados. Disponível em <<http://www.fao.org.br>>. Acesso em: 04 de fevereiro de 2017. 2014.

GARKAVA-GUSTAVSSON, L.; ZBOROWSKA, A.; SEHIC, J.; RUR, M.; NYBOM, H.; ENGLUND, J-E.; LATEUR, M.; VAN DE WEG, E.; HOLEFORS, A. **Screening of apple cultivars for resistance to European canker, *Neonectria ditissima*.** Acta Hort 976:529–536. 2013.

GHASEMKHANI, M.; LILJEROTH, E.; SEHIC, J.; ZBOROWSKA, A.; NYBOM, H. **Cut-off shoots method for estimation of partial resistance in apple cultivars to fruit tree canker caused by *Neonectria ditissima*.** Acta Agric. Scand. Sect. B Soil Plant Sci. 65, 412–421. 2015.

GONZALEZ, E; SUTTON, T.B.; CORRELL, J.C. **Clarification of the etiology of *Glomerella* leaf spot and bitter rot of apple caused by *Colletotrichum* spp. based on morphology and genetic, molecular, and pathogenicity tests.** Phytopathology 96:982-992. 2006.

GRAF, H. **Die Biologie des Obstbaumkrebses (*Nectria galligena* Bres.) als Grundlage seiner gezielten Bekämpfung.** Mitt d Obstbauversuchsrings d Alten Landes 31:68–78. 1976.

GROVE, G. G. *Nectria* canker. In: **Compendium of apple and pear diseases** (JONES, A.L.; ALDWINCKLE, H. S. eds.), pp. 34–35. St. Paul, APS. 1990.

GROVE, G.G.; DUGAN, F.M.; BOAL, R.J. **Perennial canker of apple: Seasonal host susceptibility, spore production, and perennation of *Cryptosporiopsis perennans* in infected fruit in eastern Washington.** Plant Disease, v. 75, p. 1109-1114. 1992.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento sistemático da produção agrícola**. Rio de Janeiro, v. 25, n. 2, p. 1-88, 2012. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica> >. Acesso em 29 de outubro de 2015.

JONES, A. L.; ALDWINCKLE, H.S. (Eds.) **Compendium of apple and pear diseases**. St. Paul: American Phytopathological Society. 100p. 1990.

JONES, A. L.; SUTTON, T. B. **Diseases of tree fruits in the East**. Michigan State University. 1996.

KATSURAYAMA, Y.; BONETI, J.I.S. Manejo das doenças de verão da macieira no sul do Brasil In: STADNIK MJ (Ed.) **Manejo Integrado de Doenças da Macieira**. Florianópolis, CCA-UFSC, p. 45-64. 2009.

LATORRE, B.; RIOJA, M; LILLO, C.; MUÑOZ, M. **The effect of temperature and wetness duration on infection and a warning system for European canker (*Nectria galligena*) of apple in chile**. Crop protection, v. 21, n. 4, p. 285-291. 2002.

MANTIRI, F.R.; SAMUELS, G.J.; RAHE, J.E.; HONDA, B.M. **Phylogenetic relationships in *Neonectria* species having *Cylindrocarpon* anamorphs inferred from mitochondrial ribosomal DNA sequences**. *Canadian Journal of Botany* 79: 334–340. 2001.

MCCRACKEN, A.R.; BERRIE, A.; BARBARA, D. J.; LOCKE, T.; COOKE, L.R.; PHELPS, K.; SWINBURNE, T. R.; BROWN, A. E.; ELLERKER, B.; LANGRELL, S. R. H. **Relative significance of nursery infections and orchard inoculum in the development and spread of apple canker (*Nectria galligena*) in young orchards**. *Plant Pathol* 52:553–566. 2003.

OGAWA, J. M.; ENGLISH, H. **European (*Nectria*) Canker of Apple and Pear**. In: *Diseases of temperate zone tree fruit and nut crops*. Oakland, p. 41-46. 1991.

PALM, G. **Krebsbekämpfung für den Obstbau immer noch Problem Nr. 1**. Mitt d Obstbauversuchsrings d Alten Landes 30:218

PETRI, J. L., PALLADINI, L. A.; POLA, A. C. 2006. **A cultura da macieira**. Florianópolis, EPAGRI. p.261-297. 1975.

PETRI, J. L.; LEITE, G. B.; COUTO, M.; FRANCESCOTTO, P. Avanços na cultura da macieira no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, Volume Especial, p. 48-56. 2011.

PETRI, J.L. **Desafios da pesquisa na produção integrada de maçã.** In: **Reunião Sobre o Sistema de Produção Integrada de Macieira no Brasil**, 1., Bento Gonçalves, Anais ... Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, p.1-2. 1998.

RANSOM, L. M. **The eradication of *Nectria galligena* from apple trees in Tasmania, 1954-1991.** Australas. Plant Pathology 26:121-125. 1997.

ROSSMAN, A. Y.; PALM-HERNÁNDEZ, M. E. **Systematics of plant pathogenic fungi: why it matters.** Plant Dis 92:1376–1386. 2008.

ROSSMAN, A. Y.; SAMUELS, G. J.; ROGERSON, C. T.; LOWEN, R. **Genera of the *Bionectriaceae*, *Hypocreaceae* and *Nectriaceae* (*Hypocreales*, *Ascomycetes*).** Studies in Mycology 42: 1–248. 1999.

SAKAMOTO, Y.; YAMADA, Y.; SANO, Y.; TAMAI, Y.; FUNADA, R. **Pathological anatomy of *Nectria* canker on *Fraxinus manshurica* var. *japonica*.** *Iawa Journal*, 25(2), pp. 165-174. 2004.

SANHUEZA, R. M. V. **Podridão de frutos e cancos dos ramos causados por *Cryptosporiopsis perennans* nas macieiras.** Circular Técnica. Bento Golçalves: EMBRAPA. n. 29. 2001.

SANHUEZA, R. M. V. **Ocorrência de *Cryptosporiopsis perennans* em macieiras “Fuji” no Sul do Brasil.** Summa Phytopathologica 28:204-206. 2002.

SANHUEZA, R. M. V. In: EMBRAPA. **Frutas do Brasil: Maçã – Fitossanidade.** Bento Golçalves: EMBRAPA Informações Tecnológicas, n. 38, p. 34-60. 2004.

SAURE, M. **Die Bekämpfung des Obstbaumkrebses (*Nectria galligena* Bres.).** Mitt d Obstbauversuchsringes d Alten Landes 16:225–227. 1961.

SCHIEWE, A.; MENDGEN, K. **Identification of antagonists for biological control of the post-harvest pathogens *Pezicula malicorticis* and *Nectria galligena* on apples.** J. Phytopathol. 134:229-273. 1992.

SENG, J. M.; SAINDRENAN, P.; BOMPEIX, G. **Induction of *Nectria galligena* mutants resistant to benzoic acid and study of their aggressiveness towards immature apples.** J Gen Microbiol 131:1863–1866. 1985.

SHAY, J.R. & SITTERLY, W.R. **Botryosphaeria canker of apple**. Phytopathology 44:505. (Abstract). 1954.

SHI, Y.; CORRELL, J. C.; GUERBER, J. C. **Frequency of Colletotrichum species causing bitter rot of apples in the southeastern United States**. Plant Dis. 80:692-696. 1996.

STRUBLE, F. B.; KEITT, G. W. **Variability and inheritance in Glomerella cingulata (Stonem.) S. and V. S. from apple**. Am. J. Bot. 37:563-576. 1950.

SUTTON, T. B. Bitter rot. Pages 15-16 in: **Compendium of Apple and Pear Diseases**. A. L. Jones and H. S. Aldwinckle, eds. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN. 1990.

SUTTON, T.B. & BOYNE, J.V. **Inoculum availability and pathogenic variation of *Physalospora obtusa* and *Botryosphaeria dothidea* in apple production in North Carolina**. Plant Disease 67:503-506. 1983.

SUTTON, T.B. **Production and dispersal of ascospores and conidia by *Physalospora obtusa* and *Botryosphaeria dothidea* in apple orchards**. Phytopathology 71:584-589. 1981.

SWINBURNE, T. R. **The infection of apples, cv. Bramley's Seedling, by *Nectria galligena* Bres.** Ann. Appl Biol 68:253–262. 1971.

SWINBURNE, T. R. **The effect of store conditions on the rotting of apples, cv. Bramley's seedling, by *Nectria galligena***. Ann. appl. Biol. 78, 39—48. 1974.

SWINBURNE, T. R., **European canker of apple (*Nectria galligena*)**. Review of Plant Pathology 54, 787–99. 1975.

TETLEY, U. **A study of the anatomical development of the apple and some observations on the “pectic constituents” of the cell-walls**. Journal of Pomology and Horticultural Science 8, 153–72. 1930.

VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M.; BECKER, W.; BONETI, J. I. S.; KATSURAYAMA, Y.; CZERMAINSKI, A. B. C. **Manejo das doenças de verão na produção integrada de maçã**. Circular técnica. Embrapa, n.36. 2002.

VAN DER SCHEER, H. A. T. **Bestrijding van vruchtboomkanker (*Nectria galligena*)**. *Fruitteelt* 64:1174–1177. 1974.

WAVER, D. J. **A gummosis disease of peach trees caused by *Botryosphaeria dothidea***. *Phytopathology* 64: 1429-1432. 1974.

WEBER, R. W. S. **Biology and control of the apple canker fungus, *Neonectria ditissima* (syn. *N. galligena*) from a Northwestern European perspective**. *Erwerbsobstbau* 56: 95-107. 2014.

WEBSTER, A.; CROSS, J.; BERRIE, A. **The Best Practice Guide for UK Apple Production**. London, UK: Department for Environment, Food & Rural Affairs. 2001.

XU, X-M.; BUTT, D. J.; RIDOUT, M. S. **The effects of inoculum dose, duration of wet period, temperature and wound age on infection by *Nectria galligena* of pruning wounds on apple**. *Eur J Plant Pathol* 104:511–519. 1998.

XU, X-M.; ROBINSON, J. D. **Effects of fruit maturity and wetness on the infection of apple fruit by *Neonectria galligena***. *Plant Pathol* 59:542–547. 2010.

ZELLER, S. M. **European canker of pomaceous fruit trees**. Oregon Agricultural College Station Bulletin 222: 1–52. 1926.

CAPÍTULO I

ASPECTOS FISIOLÓGICOS DE *Neonectria ditissima* E COMPONENTES DO MONOCICLO DA DOENÇA EM FRUTOS DE MACIEIRA

RESUMO

Desde 2012 casos de Cancro Europeu causado por *Neonectria ditissima* estão aumentando no Brasil e ainda poucos estudos estão disponíveis na literatura nacional. Objetivou-se com este trabalho avaliar os efeitos de diferentes temperaturas e períodos de molhamento em processos fisiológicos da fase imperfeita de *N. ditissima in vitro*, e também processos de infecção, colonização e reprodução *ex vivo* em frutos. Testou-se: i) a agressividade de 12 isolados da fase imperfeita do patógeno por meio de inoculação em frutos da cultivar Gala utilizando disco de BDA com micélio; ii) crescimento micelial e esporulação da fase imperfeita de *Neonectria ditissima* em meio BDA sob diferentes temperaturas; iii) agressividade de isolados da fase imperfeita de *Neonectria ditissima* em frutos utilizando suspensão de conídios; iv) efeito da temperatura e do período de molhamento na germinação de conídios da fase imperfeita de *N. ditissima* e, v) influência da temperatura na infecção de *N. ditissima* em frutos destacados e mantidos em temperaturas simuladas dos diferentes estados produtores de maçã (RS, SC e PR). Os isolados diferiram em relação ao tamanho de lesão provocada no fruto. Houve interação entre temperatura e diâmetro da colônia para os diferentes isolados do patógeno, sendo que para todos os isolados a temperatura de 20 °C favoreceu o maior crescimento micelial, e este é desfavorecido por temperatura de 30 °C. A relação micro/macroconídios foi menor a 10 °C para a maioria dos isolados testados. Não houve produção de macroconídios na temperatura de 30 °C para nenhum dos isolados testados. A produção de microconídios foi superior a de macroconídios para todos os isolados testados a partir da temperatura de 15 °C. O período de incubação dos isolados 32, I8 e EMB foi de 8 a 9 dias, enquanto o período de incubação ficou entre 12 e 17 dias. Com 12 horas de molhamento e 25 °C de temperatura a média de germinação dos conídios é superior a 70%. Com 48 horas de molhamento, ocorreu germinação superior a 90% independente da temperatura. Com o molhamento de 2 horas menos de 10% dos conídios germinam, independente da temperatura. Frutos da cultivar Eva incubados em temperaturas simuladas do Rio Grande do Sul e Paraná não apresentaram diferenças entre si, porém diferiram do estado de Santa Catarina com relação aos períodos de incubação e latência. As cultivares Eva e Gala não apresentaram diferença entre si com relação ao período de incubação.

Palavras chave: *Neonectria ditissima*; *Malus domestica*; doença.

ABSTRACT

Since 2012 the number of cases of European Canker, caused by *Neonectria ditissima*, has increased in Brazil and there are few studies available in the national literature. The objective of this work was to evaluate the effects of different temperatures and wetness periods on physiological processes of the imperfect stage of *N. ditissima in vitro*, as well as infection, colonization and *ex vivo* reproduction in fruits. We studied: i) the aggressiveness of 12 *N. ditissima* isolates inoculating in 'Gala' fruits using PDA discs with mycelium; ii) mycelial growth and sporulation of *N. ditissima* in PDA medium under different temperatures; iii) aggressiveness of *N. ditissima* isolates in fruits using conidial suspension; iv) effect of the temperature and wetness period on conidial germination of *N. ditissima*; v) influence of the temperature on the infection of *N. ditissima* on detached fruits kept at simulated temperatures of different apple producing states (RS, SC and PR). The isolates differed in relation to the lesion size caused in the fruit. There was interaction between temperature and colony diameter for the different isolates of *N. ditissima*, and for all the isolates the temperature of 20 °C favored mycelial growth, which is lower in temperature of 30 °C. The micro/macroconidia ratio was lower at 10 °C for most of the isolates tested. There was no production of macroconidia at 30 °C for any of the isolates tested. The microconidia production was superior to macroconidia for all isolates tested at 15 °C. The incubation period of the isolates 32, I8 and EMB was from 8 to 9 days, while the incubation period was between 12 and 17 days. With 12 hours of wetness, the temperature of 25 °C favors the germination of more than 70% of conidia. With 48 hours of wetness, germination was above 90% regardless of the temperature. Wetness of 2 hours is not sufficient for germination of 10% of conidia at any temperature. Fruits of the cultivar Eva incubated at temperatures of Rio Grande do Sul and Paraná did not present differences among themselves, but differed from the state of Santa Catarina in relation to the incubation and latent periods. The cultivars Eva and Gala did not show any differences between them in relation to the incubation period.

Key Words: *Neonectria ditissima*; *Malus domestica*; disease.

3 CAPÍTULO I: ASPECTOS FISIOLÓGICOS DE *Neonectria ditissima* E COMPONENTES DO MONOCICLO DA DOENÇA EM FRUTOS DE MACIEIRA

3.1 INTRODUÇÃO

A maçã (*Malus domestica* Borkh) está entre as quatro frutas mais consumidas no mundo. No Brasil, é comercializada nos doze meses do ano e distribuída em todo o país (PETRI; LEITE, 2008). O cultivo da macieira é atualmente uma atividade consolidada e de grande importância socioeconômica, principalmente na região sul do país, que representa mais de 95% da produção nacional de maçãs, e que atingiu em 2012 1,3 milhões de toneladas (IBGE/CEPAGRO, 2013). Os estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina se destacam, representando 95% desta produção.

A cultura da macieira apresenta várias limitações ao seu cultivo, entre elas a elevada quantidade de patologias que acometem a cultura. Dentre elas, o Cancro Europeu é a doença que mais tem preocupado os produtores atualmente, causando sintomas em ramos, tronco e, ocasionalmente, no fruto da macieira, interferindo em todas as etapas da produção, desde o preparo de mudas até a conservação das frutas. O desenvolvimento da doença em ramos e troncos pode exigir a substituição de plantas que varia de 10% até todo o talhão (ALVES, 2015).

No ano de 2012, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) confirmou casos de Cancro Europeu, causado pelo fungo *Neonectria ditissima* (Bres.) Rossman & Samuels, nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná (somente região de Palmas), sendo reconhecida como praga quarentenária A2 no Brasil (BRASIL, 2014).

O Cancro Europeu ocorre principalmente em macieiras (*Malus domestica* Borkh), mas outras espécies, como pereira (*Pyrus communis*), além de gêneros florestais em todo o mundo, como *Alnus*, *Betula*, *Fagus*, *Fraxinus*, *Ilex*, *Juglans*, *Populus*, *Tilia* e *Ulmus* (FLACK & SWINBURNE, 1977), são conhecidas como hospedeiras afetando cultivos em outras partes do mundo.

No início da infecção em ramos e troncos as lesões são pequenas, circulares com áreas marrons, depois há um afundamento escurecido na parte central e nas

margens; o crescimento do cancro é lento e a planta reage formando um tecido em volta do cancro (calo). Ao longo dos anos, o fungo invade mais tecido sadio ao redor do cancro; em consequência desse crescimento descontínuo, há formação do sintoma parecido com um alvo (ALVES et al., 2015). Essas lesões distribuem-se por toda a planta podendo levar à morte da mesma. Em frutos, o fungo causa sintoma de podridão mole, que pode ser em pré-colheita (no pomar) ou, mais comumente, em pós-colheita (armazenamento) (XU; ROBSON, 2010). A doença pode causar sérios danos devido ao apodrecimento em frutos em pomares com alto inóculo do patógeno em cancos de ramos. O patógeno sobrevive como micélio em cancos e durante o outono na forma de peritécio, o qual libera os esporos sexuais quando há umidade; estes causam novas infecções em pontos de ferimento das plantas (WEBER, 2014).

A diminuição da produção nos países produtores é dependente da suscetibilidade das variedades, da agressividade do patógeno e das condições climáticas. As cultivares de macieira que são mais cultivadas no Brasil, Gala e Fuji, são sensíveis à doença e não há variedades imunes à infecção pelo patógeno (ALVES et al., 2015). Problemas de controle de Cancro Europeu das pomáceas foram relatados em altos níveis de severidade em precipitações distintas, de 600 a 700 mm anuais no Reino Unido e 1000 mm anuais no estado da Califórnia, EUA (BERESFORD & KIM, 2011). Nas principais regiões produtoras do Brasil (Fraiburgo, São Joaquim e Vacaria), ocorrem precipitações médias anuais superiores a 1500 mm, favorecendo possíveis aumentos de incidência e severidade de Cancro.

O potencial de danos de Cancro Europeu das pomáceas na cadeia produtiva da macieira no Brasil representa um custo adicional à produção pela necessidade de controle químico e cultural da doença. Estudos sobre o agente etiológico e epidemiologia da doença nas regiões produtoras de maçã tornam-se necessários para auxiliar no manejo da doença e evitar e/ou reduzir danos e perdas. O conhecimento de características do patógeno e da epidemiologia da doença possibilitará a recomendação de manejo adequado para a pomicultura local e regional.

Enquanto o Cancro Europeu em ramos tem sido de maneira geral bem elucidado na literatura, há poucos trabalhos com infecção de *Neonectria ditissima* em frutos. Além disso, não há estudo que relate o comportamento do patógeno em frutos em condições climáticas da região sul do Brasil, onde tem se observado maior

incidência de podridão em maçãs que em outros países produtores. Isso pode ser explicado pelas condições climáticas mais favoráveis e/ou pela maior quantidade de inóculo nos pomares, devido à falta de experiência no manejo da doença (ALVES; CZERMAINSKI, 2015). Ainda é desconhecida a suscetibilidade de frutos da cultivar Eva, amplamente plantada no estado do Paraná, a *N. ditissima*.

Características fisiológicas do patógeno que parecem ter relação com a infectividade, como crescimento micelial, quantidade de esporulação a diferentes temperaturas e diferença na produção de macroconídios e microconídios (WEBER, 2014) também não foram estudados até o presente momento. A germinação de conídios *in vitro* encontrada por Latorre et al. (2014) ocorreu em temperaturas de 6 a 32 °C, desde que com período de molhamento contínuo; entretanto, se faz necessário esse estudo com isolados brasileiros para melhor entendimento do processo.

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivos estudar: i) a agressividade de 12 isolados da fase imperfeita de *N. ditissima* utilizando discos de BDA com micélio; ii) o crescimento micelial e esporulação da fase imperfeita de *N. ditissima*; iii) a agressividade de 4 isolados da fase imperfeita de *N. ditissima* utilizando suspensão de conídios; iv) o efeito da temperatura e do período de molhamento na germinação de conídios do patógeno; v) a influência da temperatura na infecção do patógeno em frutos destacados e mantidos em temperaturas simuladas dos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Obtenção dos isolados

Os 12 isolados da fase imperfeita de *Neonectria ditissima* utilizados neste estudo foram coletados nos anos de 2012 e 2016 (TABELA 1). Todos foram isolados de ramos sintomáticos de macieira e são provenientes de pomares comerciais e experimentais da cidade de Vacaria, no Rio Grande do Sul.

TABELA 1. DATA DA COLETA, LOCAL DA COLETA, TIPO DE ISOLAMENTO E CÓDIGO DOS ISOLADOS DE *Neonectria ditissima*

Data da coleta	Local da coleta	Tipo de isolamento	Código
09/2012	Vacaria (RS)	Indireto	5102
09/2012	Vacaria (RS)	Indireto	101EJQ
09/2012	Vacaria (RS)	Indireto	28
09/2012	Vacaria (RS)	Indireto	5455
09/2012	Vacaria (RS)	Indireto	32
09/2012	Vacaria (RS)	Indireto	I8
02/2016	Pomar Schio - Vacaria (RS)	Indireto	FRR01
02/2016	Pomar Schio - Vacaria (RS)	Direto	FRRAA
02/2016	Pomar EEFCT Embrapa - Vacaria (RS)	Indireto	EMB
02/2016	Pomar EEFCT Embrapa - Vacaria (RS)	Indireto	EMB01
02/2016	Pomar Frutirol - Vacaria (RS)	Indireto	FRT01
02/2016	Pomar Frutirol - Vacaria (RS)	Indireto	FRT03

3.2.2 Agressividade de isolados da fase imperfeita de *Neonectria ditissima* em frutos da cultivar Gala utilizando disco de micélio

Frutos da cultivar Gala tiveram superfície desinfestada pela imersão em álcool 70% durante um minuto, logo em seguida em hipoclorito de sódio a 1% e enxaguados três vezes em água destilada. Para a secagem, os frutos foram mantidos sobre papel toalha durante quatro horas em temperatura ambiente. Estes foram, então, colocados individualmente em potes plásticos contendo papel de filtro umedecido. Sobre a epiderme da região carnosa próxima ao pedicelo dos frutos foram feitos dois ferimentos de 5 mm de profundidade com palitos de dente autoclavados. Discos de Batata Dextrose Ágar (BDA) de 5 mm contendo micélio, extraídos do bordo de colônias de sete dias dos 12 isolados da fase imperfeita de *Neonectria ditissima*, foram transferidos para os locais de ferimentos nos frutos. Frutos inoculados com discos de meio de cultura sem as estruturas do patógeno foram utilizados como controle.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo composto de 3 repetições por isolado e 3 frutos testemunha. Cada repetição foi representada por um fruto. O experimento foi realizado duas vezes e os resultados expressos em

média. Após a inoculação os frutos foram acondicionados em câmara de crescimento vegetal (Convicon[®]), a temperatura de 23 °C e fotoperíodo de 12 horas. A avaliação foi feita ao 20º dia, por meio da medição do diâmetro das lesões com um paquímetro digital.

A homogeneidade das variâncias foi verificada pelo teste de Bartlett e então os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), verificando o efeito de cada isolado pelo F teste. Quando o teste foi significativo, as médias dos diâmetros das lesões foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$). Não foi realizada nenhuma transformação dos dados para as análises nestes experimentos. Todas as análises foram realizadas utilizando o software R (R Core Team) utilizando o pacote ExpDes.

3.2.3 Crescimento micelial e esporulação da fase imperfeita de *Neonectria ditissima* em meio BDA sob diferentes temperaturas

Discos de micélio de 5 mm de diâmetro retirados do bordo das colônias de sete dias de idade com crescimento ativo dos isolados FRR01, 32, I8 e EMB da fase imperfeita de *Neonectria ditissima* foram transferidos individualmente para o centro de placas de Petri de vidro (8 cm de diâmetro), contendo 10 mL de BDA. As placas assim preparadas foram incubadas a temperaturas de 10, 15, 20, 25 e 30°C, em fotoperíodo de 12 horas, em câmaras de crescimento BOD (Biochemical Oxygen Demand).

Foram traçadas, no fundo de cada placa, duas retas perpendiculares, e a média das duas medições foi registrada com auxílio de paquímetro ao 25º dia. Após mensuração do crescimento micelial, foram preparadas suspensões de conídios de cada colônia obtida, utilizando-se 1 mL de água destilada e uma alça de Drigalsky para facilitar a remoção dos conídios. A quantificação dos conídios na suspensão foi determinada utilizando-se câmara de Neubauer, sendo que os resultados foram expressos em número de conídios por mL da suspensão (n° de conídios mL^{-1}), contando separadamente macroconídios e microconídios. A partir do número total de conídios e da área da colônia de onde foram retirados, obtida por meio da

fórmula da área de um círculo, calculou-se a quantidade de conídios produzidos por milímetro quadrado da placa, por meio da fórmula:

$$P = C/A$$

P = produção de conídios por milímetro quadrado de colônia

C = quantidade total de conídios produzidos pela colônia

A = área da colônia (mm²), obtida por meio da fórmula $A = \pi(D/2)^2$, onde D = diâmetro médio da colônia

O delineamento dos experimentos de crescimento micelial e esporulação foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 4 x 5, consistindo de 4 isolados em 5 temperaturas, sendo 7 repetições (placas) por isolado e fator. A homogeneidade das variâncias foi verificada pelo teste de Bartlett e então os dados de crescimento micelial e esporulação em cada temperatura foram submetidos à análise de variância (ANOVA), verificando o efeito de cada isolado e de cada temperatura pelo F teste. Quando o teste foi significativo, as médias do número de conídios foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$). Não foi realizada nenhuma transformação dos dados para as análises nestes experimentos. Todas as análises foram realizadas utilizando o software R (R Core Team) utilizando o pacote ExpDes.

3.2.4 Agressividade de isolados da fase imperfeita de *Neonectria ditissima* em frutos utilizando suspensão de conídios

Com os isolados FRR01, 32, I8 e EMB da fase imperfeita de *Neonectria ditissima* realizou-se inoculação de frutos da cultivar Gala com suspensão de conídios, e concomitantemente foi feito o teste de germinação dos conídios desses isolados, para garantir sua viabilidade.

Colônias de sete dias de idade com crescimento em meio BDA com 2 mL de água destilada esterilizada foram raspadas com auxílio de alça de Drigalsky esterilizada; a suspensão da raspagem da placa foi filtrada em gaze esterilizada. As suspensões foram agitadas e a concentração dos conídios foi aferida em câmara de Neubauer em microscópio óptico, e ajustadas a concentração de 10^5 conídios mL⁻¹.

Para a avaliação da capacidade germinativa dos isolados, foram preparadas 20 placas de Petri contendo 10 mL de meio Ágar Água (AA) em cada placa para

realização do teste de germinação de conídios, sendo cinco placas para cada isolado. Nas placas contendo meio AA foram depositados 50 µL de suspensão, que foi espalhada suavemente por meio de alça de Drigalsky. As placas foram mantidas por 24 horas em BOD sem fotoperíodo a temperatura de 25°C, e após esse período a germinação foi paralisada pela adição de Lactofenol com corante Azul de Amann, para facilitar posterior visualização dos conídios e contagem da germinação em microscópio de luz (Olympus®).

O delineamento foi inteiramente casualizado com 5 repetições por isolado. Cada repetição consistiu de um fruto. O experimento foi repetido, sendo que cada repetição foi denominada E1 e E2.

Frutos foram desinfestados por imersão em álcool 70% durante um minuto, imersão em hipoclorito de sódio a 1% e três enxagues em água destilada; posteriormente, foram deixados secar sobre papel toalha e colocados em potes plásticos transparentes. Na parte superior dos frutos foram feitos dois ferimentos de 5 mm de profundidade com palitos de dente autoclavados, imediatamente inoculados com 50 µL de suspensão em cada ferimento por meio de pipeta. Os potes com os frutos inoculados foram armazenados em prateleiras em sala climatizada a 25°C, e a avaliação foi feita por meio de medição do tamanho das lesões com auxílio de paquímetro digital, no 20º dia.

A homogeneidade das variâncias foi verificada pelo teste de Bartlett e então os dados de esporulação em cada temperatura foram submetidos à análise de variância (ANOVA), verificando o efeito de cada isolado e de cada temperatura pelo F teste. Quando o teste foi significativo, as médias do número de conídios foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$). Não foi realizada nenhuma transformação dos dados para as análises nestes experimentos. Todas as análises foram realizadas utilizando o software R (R Core Team) utilizando o pacote ExpDes.

3.2.5 Efeito da temperatura e do período de molhamento na germinação de conídios de *Neonectria ditissima*

O isolado escolhido para este ensaio foi o EMB. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 5 x 7, consistindo de 5

temperaturas (10, 15, 20, 25 e 30 °C) e 7 períodos de molhamento (0, 2, 4, 8, 12, 24 e 48 horas), com 4 repetições. Cada repetição consistiu de uma placa.

A suspensão de conídios foi preparada, estimada em câmara de Neubauer e ajustada para 10^6 conídios mL^{-1} . Em cada placa de Petri de vidro (15 x 90 mm) foram depositadas 4 alíquotas de 10 μL de suspensão. A porcentagem de germinação por placa foi determinada por meio da média da germinação das quatro alíquotas. As placas foram colocadas em caixas plásticas (Gerbox) desinfestadas com álcool (70 %), contendo um algodão embebido em água para garantir que as alíquotas não secassem; as Gerbox contendo as placas foram envoltas em papel alumínio para mantê-las no escuro, e então foram armazenadas em câmaras de crescimento tipo BOD, nas diferentes temperaturas.

Após os intervalos de tempo dos períodos de molhamento adicionou-se a cada gota 20 μL de lactofenol para interrupção do processo de germinação. Os tratamentos foram avaliados em microscópio de luz (Olympus®) em aumento de 40 vezes, contando-se 100 conídios em cada alíquota e classificando-os como germinados e não germinados. Foram considerados germinados os conídios que apresentaram tubo germinativo maior que o diâmetro do conídio.

Para a estimativa das equações foram utilizados os dados de temperatura entre 10 e 30°C. O gráfico superfície de resposta foi realizado utilizando o software R (R Core Team) utilizando o pacote Manipulate.

3.2.6 Influência da temperatura na infecção da fase imperfeita de *Neonectria ditissima* em frutos destacados e mantidos em temperaturas simuladas de diferentes estados produtores de maçã

Para este experimento o isolado utilizado foi o EMB. Frutos destacados das cultivares Gala e Eva foram desinfestados por imersão em álcool 70% durante 1 minuto, imersão em hipoclorito de sódio a 1% e três enxágues em água destilada; posteriormente, foram secados sobre papel toalha e colocados em potes plásticos transparentes. Posteriormente, dois ensaios foram conduzidos. Em um ensaio os frutos foram inoculados em ferimentos de 5 mm de profundidade, feitos com palitos de dente autoclavados na parte superior dos frutos. Em outro ensaio, os frutos foram

inoculados sem fermento. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com 10 repetições por temperatura simulada por ensaio. Cada repetição consistiu de um fruto.

A suspensão de conídios inoculada foi preparada a partir de colônia da fase imperfeita de *Neonectria ditissima* de sete dias de crescimento em meio BDA, com 2 mL de água destilada esterilizada e raspadas com auxílio de alça de Drigalsky esterilizada; a suspensão da raspagem da placa foi filtrada em gaze esterilizada. A suspensão foi agitada e a concentração dos conídios foi aferida em câmara de Neubauer em microscópio de luz e ajustadas à concentração de 10^6 conídios mL⁻¹. Após preparo da suspensão, alíquotas de 30 µL foram imediatamente inoculadas nos frutos. Alíquotas de 30 µL da suspensão foram depositadas em placas contendo 10 mL meio Ágar-Água (AA), para avaliação da capacidade germinativa do isolado em cada temperatura simulada.

Os frutos inoculados foram acondicionados em câmara úmida e mantidos em câmaras de crescimento Conviron[®], com temperaturas médias da época de colheita de maçãs dos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (TABELA 2). Escolheu-se a região de Curitiba no Paraná para entender o comportamento do patógeno em frutos nessa região, que ainda não possui relato da doença. As temperaturas foram definidas ao longo do dia de acordo com a disponibilidade dos dados fornecidos pelo Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE). Avaliou-se a incidência diariamente, a partir do aparecimento da primeira lesão até a senescência dos frutos; posteriormente, foi calculada a área abaixo da curva de incidência (Berger, 1998) para determinar a influência dessa variável no tempo. Também foram avaliados período de incubação e latente, e a partir desses dados foi realizada análise de sobrevivência.

TABELA 2. MÉDIAS DE TEMPERATURA (°C) DA ÉPOCA DE COLHEITA DA MACIEIRA (DEZEMBRO A FEVEREIRO) ENTRE OS ANOS DE 2010 E 2016 PARA OS ESTADOS DO PARANÁ, SANTA CATARINA E RIO GRANDE DO SUL, COM INTERVALOS DISTRIBUÍDOS AO LONGO DO DIA DE ACORDO COM A DISPONIBILIDADE DOS DADOS

Local	Intervalo de horários				
	9:00-11:59	12:00-14:59	15:00-17:59	18:00-20:59	21:00-8:59
Curitiba (PR)	21,4	25,0	25,0	21,4	19,9
São Joaquim (SC)	18,5	21,7	21,7	18,5	16,8
Bom Jesus (RS)	18,9	19,9	22,4	19,9	18,9

FONTE: INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS (INPE)

A distribuição do período de incubação e do período de latência no tempo foi analisada plotando-se as densidades e as frequências acumuladas comparando os diferentes estados. Mudanças nas curvas de densidade foram analisadas com duas amostras do teste de Kolmogorov-Smirnov. O teste não paramétrico de Kolmogorov-Smirnov comparou as distribuições das frequências acumuladas dos dados no tempo e forneceu a máxima diferença entre as distribuições. Diferenças no tempo para o aparecimento dos sintomas (período de incubação) e no tempo para o aparecimento dos sinais (período de latência) foram verificadas com o teste-t de Welch e foram consideradas significativas quando $P < 0.05$ (R Core Team 2016) com os pacotes `lattice`, `latticeExtra`, `gridExtra`, `grid`, `devtools`, `reshape`, `doBy`, `multcomp`, `plyr`, `MASS`, `wzRfun`.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Agressividade de isolados da fase imperfeita de *Neonectria ditissima* em frutos da cultivar Gala utilizando disco de micélio

Dentre os doze isolados analisados, os isolados FRR01, FRRAA, 32, I8 e 28 foram os mais agressivos (TABELA 3); os isolados FRT03 e 5455 causaram as menores lesões nos frutos inoculados. Os diâmetros das lesões variaram em até 22,7 mm (de 9,5 a 32,2 mm).

3.3.2 Taxa de crescimento micelial e esporulação da fase imperfeita de *Neonectria ditissima* em meio BDA sob diferentes temperaturas

Houve interação entre temperatura e diâmetro da colônia para os diferentes isolados da fase imperfeita de *N. ditissima* (TABELA 4). Para todos os isolados a temperatura de 20 °C favoreceu o maior crescimento micelial; no entanto, nas

temperaturas de 15 e 30 °C observaram-se diferenças significativas entre os isolados.

Os isolados FRR01 e EMB tiveram comportamento semelhante nas diferentes temperaturas testadas, crescendo mais a 20 °C. As temperaturas intermediárias foram de 10, 15 e 25 °C. A 30 °C apresentaram redução no seu crescimento. O isolado 32 teve maior diâmetro de micélio quando incubado em temperaturas de 15 e 20 °C, que não diferiram significativamente entre si; a 10 °C cresceu significativamente mais que a 25 e 30 °C. O isolado I8 também teve 15 e 20 °C como as melhores temperaturas para o crescimento micelial; a 25 °C ele cresceu mais que a 10 °C, que por sua vez foi melhor para o crescimento que a temperatura de 30 °C. O diâmetro da colônia avaliado variou de 63,46 mm na temperatura de 20 °C (isolado 32), o menor diâmetro foi de 11,97 mm na temperatura de 30 °C (isolado FRR01).

TABELA 3. DIÂMETRO MÉDIO DE LESÕES 20 DIAS APÓS A INOCULAÇÃO COM DISCO DE BDA COM MICÉLIO DE ISOLADOS DE *Neonectria ditissima* ORIUNDOS DO MUNICÍPIO DE VACARIA (RS) EM FRUTOS DE MACIEIRA CULTIVAR GALA COM FERIMENTO, MANTIDOS A 23°C EM CÂMARAS DE CRESCIMENTO CONVIRON®.

Isolado	Ano	Diâmetro da lesão
FRR01	2016	32,2* a
FRRAA	2016	26,4 b
32	2012	26,3 b
I8	2012	25,9 b
28	2012	24,2 b
EMB	2016	22,1 c
5102	2012	21,0 d
EMB01	2016	17,8 e
FRT01	2016	15,4 f
101EJQ	2012	13,7 f
FRT03	2016	10,8 g
5455	2012	9,5 g

*Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Skott knott a 5% de probabilidade.

As curvas que representam o comportamento das colônias de *Neonectria ditissima* em diferentes temperaturas com suas respectivas funções quadráticas estão ilustradas na FIGURA 2. Os pontos de máximo crescimento da colônia

observados foram nas temperaturas de 16,60 °C (isolado EMB), de 17,33 °C (isolado FRR01), de 17,71 °C (isolado EMB) e de 18,42 °C (isolado I8).

TABELA 4. DIÂMETRO DA COLÔNIA DE ISOLADOS DE *Neonectria ditissima* EM MEIO DE CULTURA BDA, APÓS 20 DIAS DE INCUBAÇÃO EM DIFERENTES TEMPERATURAS.

Isolado	Temperatura (°C)				
	10	15	20	25	30
FRR01	49,95* aB	54,38 bB	60,42 aA	51,32 aB	11,97 bC
32	55,19 aB	60,74 aA	63,46 aA	48,87 aC	12,20 bC
I8	42,66 aC	59,89 aA	61,53 aA	52,96 aB	21,99 aD
EMB	49,10 aB	52,37 bB	61,54 aA	53,72 aB	15,62 bC

*Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem significativamente entre si pelo teste de Skott knott a 5% de probabilidade.

As curvas que representam o comportamento das colônias de *Neonectria ditissima* em diferentes temperaturas com suas respectivas funções quadráticas estão ilustradas na FIGURA 2. Os pontos de máximo crescimento da colônia observados foram nas temperaturas de 16,60 °C (isolado EMB), de 17,33 °C (isolado FRR01), de 17,71 °C (isolado EMB) e de 18,42 °C (isolado I8).

A produção média de microconídios e macroconídios dos quatro isolados de *Neonectria ditissima* testados está ilustrada na FIGURA 3, com maior produção e variação para os microconídios. A quantidade de macroconídios e microconídios produzida por mm² de colônias aos 25 dias de idade teve grande variação entre repetições do mesmo isolado para a produção de conídios.

Não houve diferença entre a produção de microconídios nem de macroconídios em qualquer temperatura entre isolados (TABELA 5). Com relação às diferentes temperaturas de incubação, para o isolado 32 as temperaturas de 20 e 25 °C foram significativamente melhores para a produção de microconídios. Para o isolado I8 a maior quantidade foi observada apenas na temperatura de 20 °C. Para os demais isolados não houve diferença na esporulação em relação à temperatura.

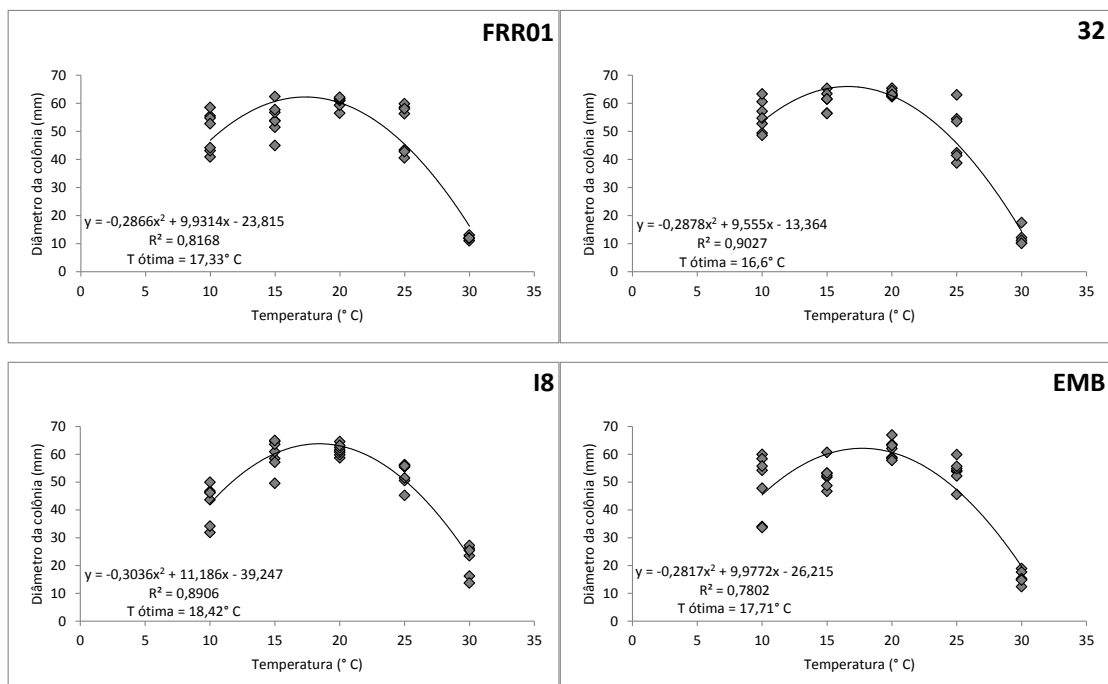


FIGURA 2. CURVAS DO DIÂMETRO DA COLÔNIA DE ISOLADOS DA FASE IMPERFEITA DE *Neonectria ditissima* EM MEIO DE CULTURA BDA, APÓS 20 DIAS DE INCUBAÇÃO EM DIFERENTES TEMPERATURAS, E TEMPERATURAS ÓTIMAS PARA O CRESCIMENTO MICELIAL DE CADA ISOLADO.

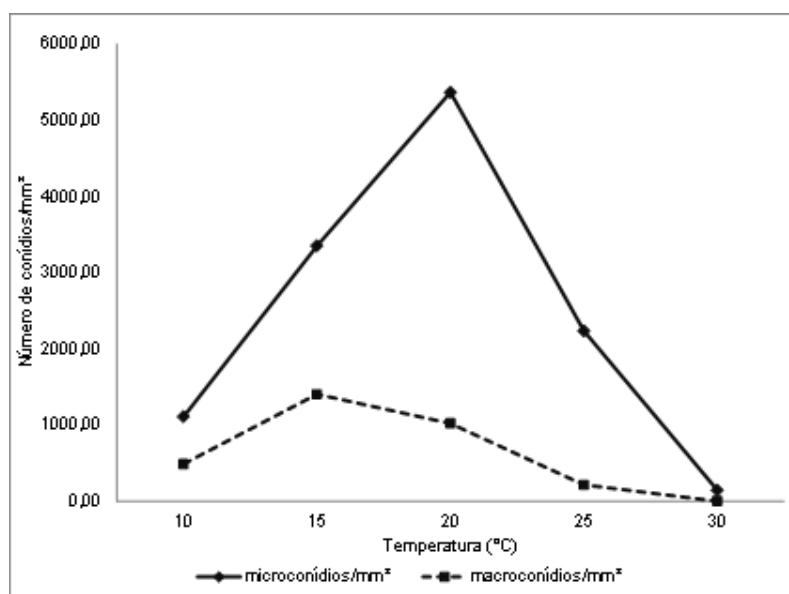


FIGURA 3. MÉDIA DA PRODUÇÃO DE MACROCONÍDIOS (LINHA CONTÍNUA) E MICROCONÍDIOS (LINHA TRACEJADA) DE QUATRO ISOLADOS DA FASE IMPERFEITA DE *Neonectria ditissima* (FRR01, 32, I8 E EMB) EM DIFERENTES TEMPERATURAS.

TABELA 5. PRODUÇÃO DE MACROCONÍDIOS E MICROCONÍDIOS POR mm² DE COLÔNIA E RELAÇÃO MICROCONÍDIOS E MACROCONÍDIOS EM DIFERENTES TEMPERATURAS POR ISOLADOS DA FASE IMPERFEITA DE *Neonectria ditissima* EM PLACAS COM MEIO BDA.

Isolado	Temperatura (°C)				
	10	15	20	25	30
Microconídios					
FRR01	780,2 aA	3717,9 aA	6182,4 aA	1533,7 aA	70,2 aA
32	1026,1 aB	1370,3 aB	5072,9 aA	2965,1 aA	0,0
I8	401,5 aA	145,0 aB	423,7 aA	226,6 aB	0,0
EMB	52,5 aA	2082,0 aA	1415,2 aA	1827,9 aA	190,4 aA
Média	565,1	1828,8	3273,5	1638,3	65,1
Macroconídios					
FRR01	289,4 aA	2580,9 aA	2013,4 aA	179,5 aA	0,0
32	136,7 aA	112,2 aA	51,0 aA	104,2 aA	0,0
I8	565,4 aC	83,7 aA	94,0 aA	150,0 aB	0,0
EMB	97,3 aB	42,5 aB	138,0 aA	119,9 aB	0,0
Média	272,2	704,8	574,1	138,4	0,0
Relação micro/macroconídios					
FRR01	2,70	1,44	3,07	8,54	0,0
32	7,51	12,22	99,51	28,47	0,0
I8	0,71	1,73	4,51	1,51	0,0
EMB	0,54	48,98	10,25	15,24	0,0
Média	2,08	2,59	5,70	11,84	0,0

*Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e mesma letra maiúscula na linha não diferem significativamente entre si pelo teste de Skott knott a 5% de probabilidade.

Não houve produção de macroconídios na temperatura de 30 °C para nenhum dos isolados. Os isolados I8 e EMB variaram em relação à temperatura, apresentado maior produção de macroconídios nas temperaturas de 15 e 20 °C, respectivamente. Os demais isolados não tiveram diferença estatística na produção de macroconídios nas diferentes temperaturas.

A partir da temperatura de 15 °C a produção de microconídios é superior à produção de macroconídios em qualquer temperatura, independente do isolado avaliado. O isolado FRR01 foi o que apresentou o maior número de microconídios e macroconídios, enquanto o isolado I8 produziu a menor quantidade desses dois tipos de conídios dentre os isolados testados.

3.3.3 Agressividade de isolados da fase imperfeita de *Neonectria ditissima* em frutos utilizando suspensão de conídios

O isolado I8 teve maior área abaixo da curva de progresso do diâmetro das lesões (AACPD), diferindo significativamente dos isolados 32 e EMB (TABELA 6). O período de incubação no experimento 1 foi de 8 a 9 dias, e no experimento 2 esse período foi de 8 dias para todos os isolados. Já o período de latência foi de 12 dias para isolado 32 no experimento 1, e de 16 e 17 dias para os isolados EMB e I8, respectivamente no experimento 2. Para os demais isolados e temperaturas, o período de latência ainda não havia ocorrido quando o experimento foi finalizado ao 20º dia. O isolado FRR01 não teve seu resultado apresentado, pois teve comportamento desuniforme e por não ter apresentado período de Latência em nenhum dos experimentos.

As curvas de incidência de podridão de frutos por *Neonectria ditissima* e as curvas do progresso do diâmetro das lesões estão representadas na TABELA 6. Os isolados EMB e I8 causaram sintomas em 7 frutos, enquanto que o isolado 32 causou lesão em 6 frutos no dia em que atingiram o período de incubação. O isolado I8 foi o que causou sintoma em todos os frutos em menor tempo, enquanto o isolado 32 só causou sintoma na totalidade dos frutos depois de 10 dias da inoculação. O isolado I8 causou os maiores e o isolado 32 causou os menores diâmetros de lesões nos frutos.

TABELA 6. ÁREA ABAIXO DA CURVA DE PROGRESSO DO DIÂMETRO DE LESÕES (AACPD) CAUSADAS POR DIFERENTES ISOLADOS DA FASE IMPERFEITA DE *Neonectria ditissima* INOCULADAS EM FRUTOS DA CULTIVAR GALA (MÉDIA DOS EXPERIMENTOS), PERÍODO DE INCUBAÇÃO (PI) E PERÍODO DE LATÊNCIA (PL) DO EXPERIMENTO 1 (E1) E EXPERIMENTO 2 (E2).

Isolado	AACPD	PI (dias)		PL (dias)	
		E1	E2	E1	E2
32	155,82 b	9	8	12	NO
I8	224,21 a	8	8	NO	17
EMB	180,93 b	8	8	NO	16

*médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Skott knott a 5% de probabilidade.

NO = não observado.

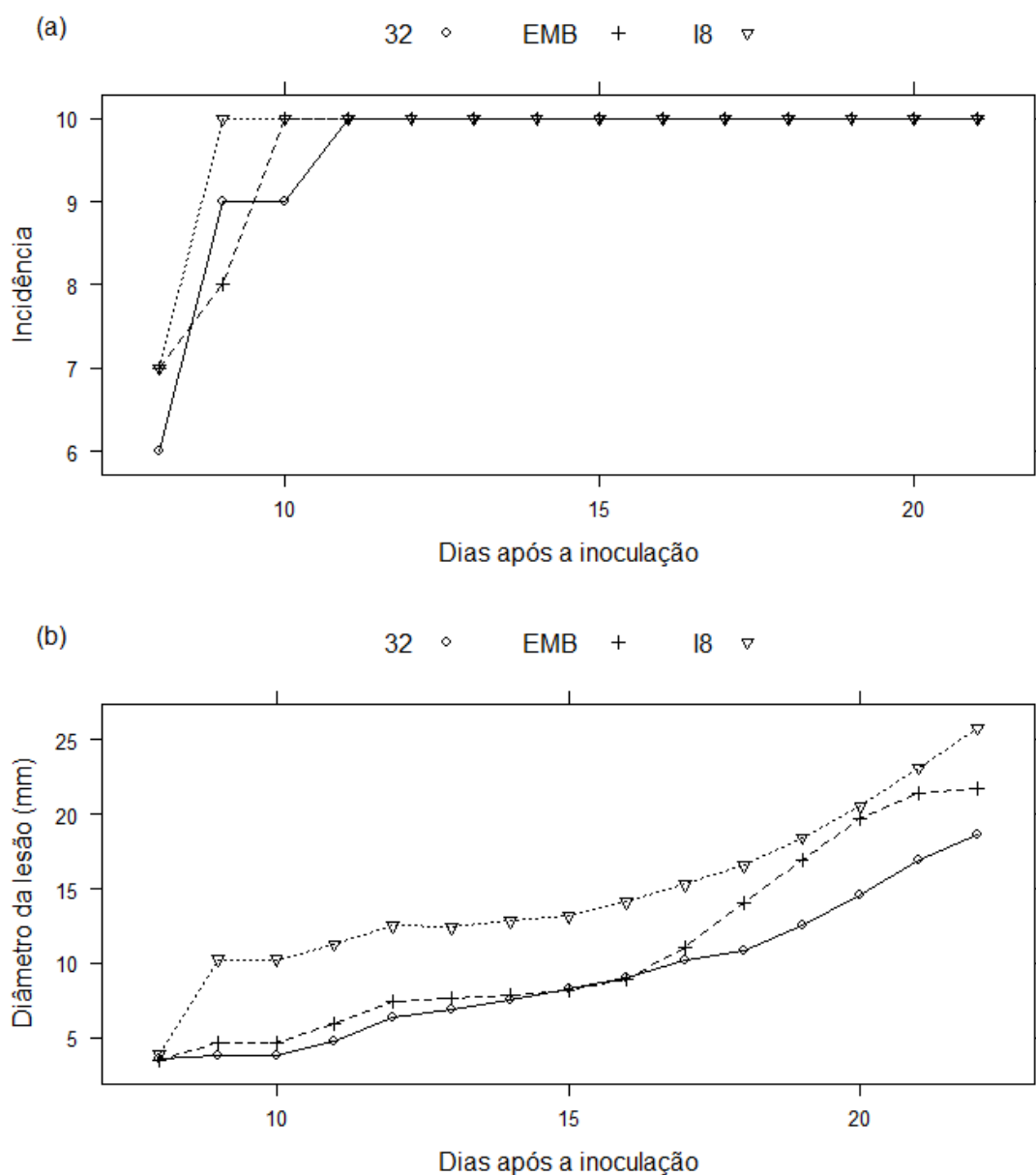


FIGURA 4. CURVAS DE INCIDÊNCIA DA DOENÇA EM NUMERO DE FRUTOS (N=10) (a) E PROGRESSO DO DIÂMETRO DE LESÕES (b) CAUSADOS POR DIFERENTES ISOLADOS DA FASE IMPERFEITA DE *Neonectria ditissima* EM FRUTOS DE MAÇÃ DA CULTIVAR GALA.

3.3.4 Efeito da temperatura e do período de molhamento na germinação de conídios da fase imperfeita de *Neonectria ditissima*

Com 12 horas de molhamento, a temperatura de 25 °C favorece a germinação de mais de 70% dos conídios (FIGURA 5). Com 48 horas de

molhamento, ocorreu germinação superior a 90% independente da temperatura. Com 8 horas de molhamento, a temperatura de 20 °C favoreceu a germinação mais que a temperatura de 25 °C, ultrapassando 50% de germinação. Com 4 horas de molhamento e 25 °C de temperatura a germinação foi superior a 10%, enquanto que 2 horas não foram suficientes para 10% dos conídios germinarem. Os conídios avaliados no momento 0, imediatamente paralisada com Lactofenol, não germinaram.

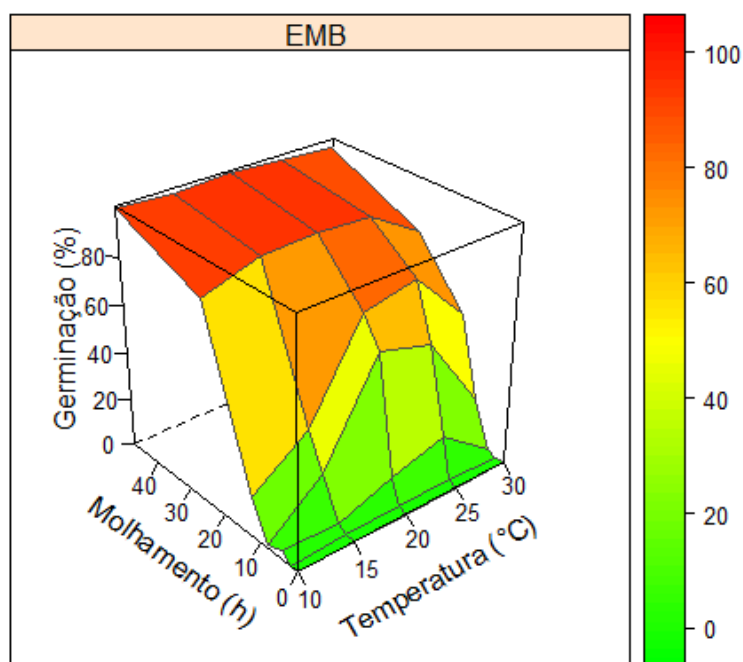


FIGURA 5. SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DE GERMINAÇÃO DE CONÍDIOS DA FASE IMPERFEITA DE *Neonectria ditissima*, EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA E DO PERÍODO DE MOLHAMENTO, PARA O ISOLADO EMB.

3.3.5 Influência da temperatura na infecção da fase imperfeita de *Neonectria ditissima* em frutos destacados e mantidos em temperaturas simuladas de diferentes estados produtores de maçã

Frutos inoculados sem ferimentos não apresentaram sintoma até o último dia de avaliação. Nos estados de PR e RS a maior densidade de aparecimento de sintomas foi aos 9 dias, já no estado de SC esta distribuição foi homogênea ao longo

do tempo tendo picos de densidade, mesmo que menores, aos 11 e 12 dias (FIGURA 6a). Diferenças significativas no tempo para o aparecimento dos sintomas foram observadas na frequência acumulada entre PR e SC ($p=1,8 \times 10^{-7}$) e entre RS e SC ($p=2,6 \times 10^{-5}$) (FIGURA 6b).

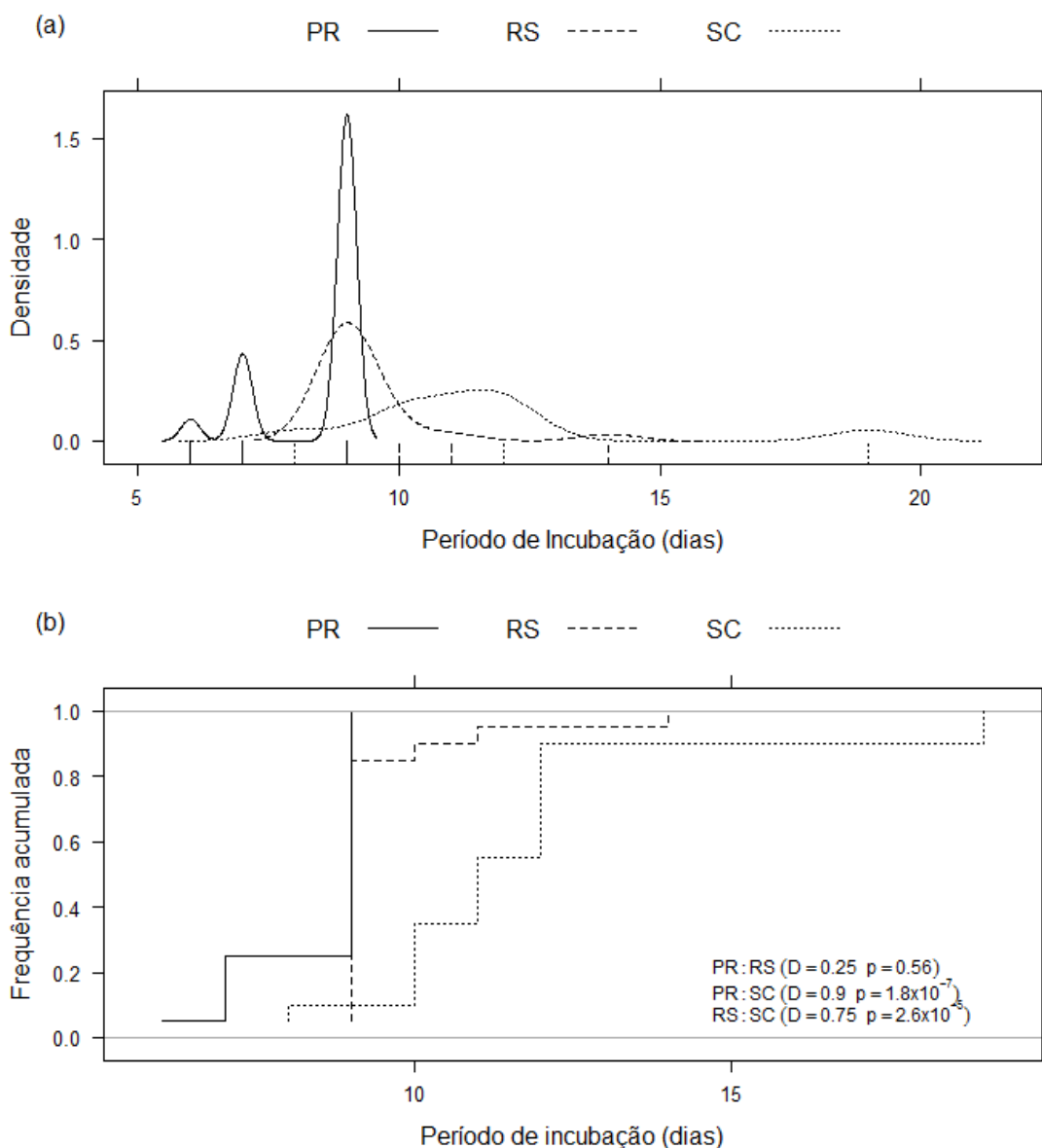


FIGURA 6. DISTRIBUIÇÃO DA DENSIDADE (a) E FREQUÊNCIA ACUMULADA RELATIVA (b) PARA O PERÍODO DE INCUBAÇÃO PARA A FASE IMPERFEITA DE *Neonectria ditissima* EM FRUTOS DE MACIEIRA DA CULTIVAR EVA, PARA AS TEMPERATURAS SIMULADAS DOS DIFERENTES ESTADOS DA REGIÃO SUL, PR= PARANÁ, RS= RIO GRANDE DO SUL E SC= SANTA CATARINA.

Nos estados de PR maior densidade para o início da reprodução ocorreu aos 15 e 20 dias, e no RS aos 18 e também aos 20 dias. Já no estado de SC esta

distribuição foi homogênea ao longo do tempo tendo picos de densidade, mesmo que menores, aos 20 e 27 dias (FIGURA 7a). Diferenças significativas no tempo para o aparecimento dos sinais foram observadas na frequência acumulada entre PR e SC ($p=0,0135$) e entre RS e SC ($p=0,0135$) (FIGURA 7b).

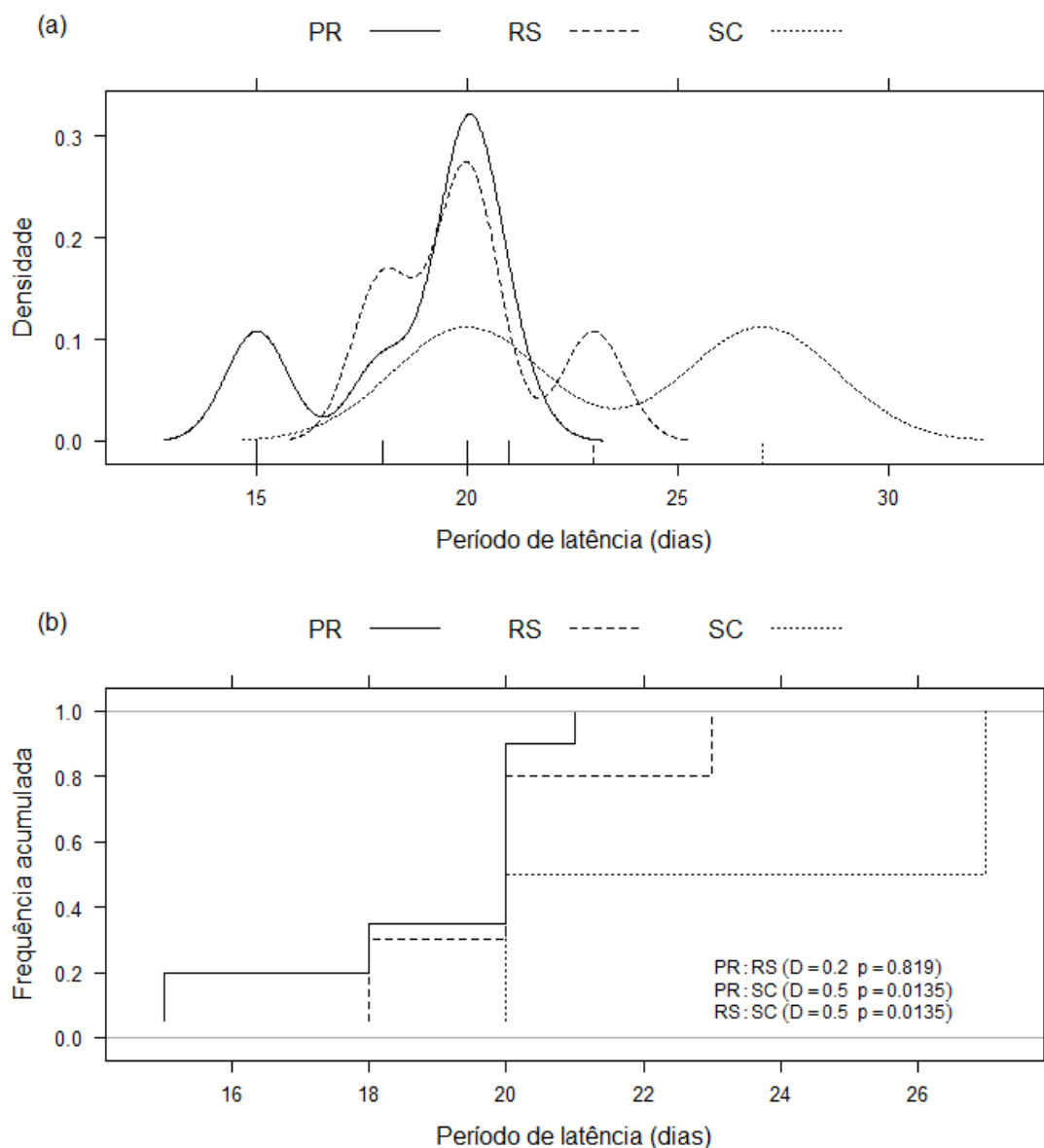


FIGURA 7. DISTRIBUIÇÃO DA DENSIDADE (a) E FREQUÊNCIA ACUMULADA RELATIVA (b) PARA O PERÍODO DE LATÊNCIA PARA A FASE IMPERFEITA DE *Neovectria ditissima* EM FRUTOS DE MACIEIRA DA CULTIVAR EVA, PARA AS TEMPERATURAS SIMULADAS DOS DIFERENTES ESTADOS DA REGIÃO SUL, PR= PARANÁ, RS= RIO GRANDE DO SUL E SC= SANTA CATARINA.

O comportamento das duas principais cultivares de macieira mais produzidas no estado do Paraná, Gala e Eva, foram semelhantes, com ambas apresentando o

pico do período de incubação aos 22 dias (FIGURA 8a). Com relação a frequência acumulada também não foi evidenciada diferença entre estas duas cultivares para o tempo de aparecimento dos sintomas. (FIGURA 8b).

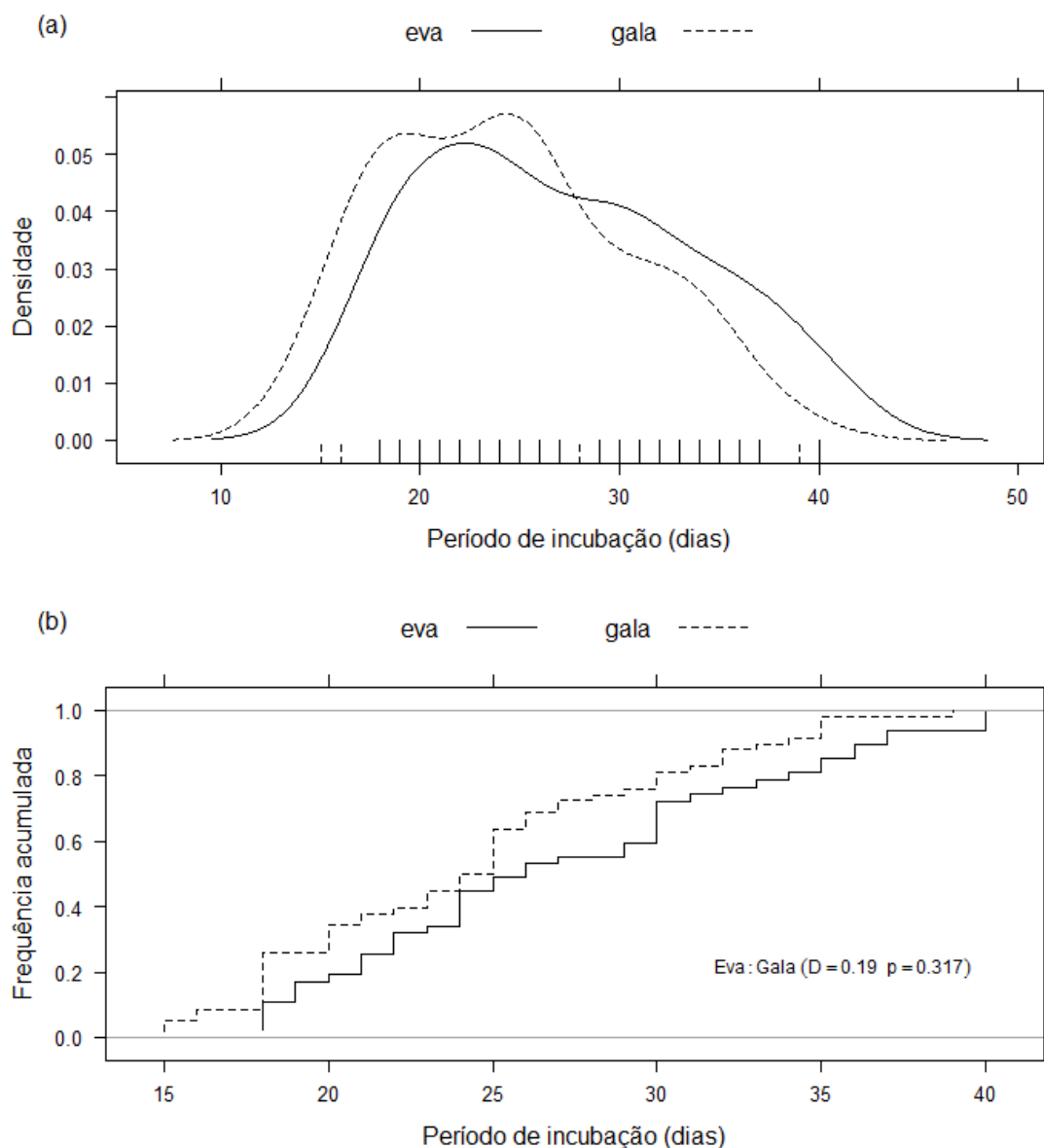


FIGURA 8. DISTRIBUIÇÃO DA DENSIDADE (a) E FREQUÊNCIA ACUMULADA RELATIVA (b) PARA O PERÍODO DE INCUBAÇÃO PARA A FASE IMPERFEITA DE *Neovectria ditissima* EM FRUTOS DE MACIEIRA DAS CULTIVARES EVA E GALA, PARA AS TEMPERATURAS SIMULADAS DOS DIFERENTES ESTADOS DA REGIÃO SUL, PR= PARANÁ, RS= RIO GRANDE DO SUL E SC= SANTA CATARINA

3.4 DISCUSSÃO

A produção de maior quantidade de macroconídios foi induzida por temperaturas inferiores a 15 °C, enquanto temperaturas maiores favoreceram a predominância de microconídios, estruturas menos comumente encontradas em infecções a campo. Isolados coletados de diferentes anos provenientes de Vacaria (Rio Grande do Sul) em geral não diferiram em relação aos aspectos fisiológicos. As condições climáticas durante a época da colheita da maçã no estado do Paraná propiciam condições tão favoráveis quanto àquelas de áreas produtoras do estado do Rio Grande do Sul para a podridão de frutos causada por *Neonectria ditissima*. Frutos da cultivar Eva, muito produzidos no estado do Paraná, se mostraram tão suscetíveis quanto frutos da cultivar Gala. O período de incubação do patógeno em frutos foi menor ao relatado para ramos em campo. Observou-se pequena variação no tamanho de lesão comparando isolados, mas estas, independente do tamanho, causam perda do valor comercial do produto. As diferenças de temperatura entre estados resultaram em período de latência menor para os estados do RS e PR em comparação ao estado de Santa Catarina, sendo a diferença em média de uma semana para o aparecimento dos sinais nos frutos o que indica que em frutos se espera epidemias menos severas nas condições catarinenses.

Em relação às cultivares o presente trabalho demonstrou que frutos de Eva e Gala apresentaram suscetibilidade semelhante à podridão por *N. ditissima* para as temperaturas simuladas dos três estados da Região Sul. Portanto, são necessárias medidas de controle para ambas as cultivares. Frutos maduros de maçã possuem maior sensibilidade à infecção pelo patógeno (XU; ROBINSON, 2010) devido à menor produção de Ácido Benzoico, um importante composto relacionado à resistência de frutos em períodos anteriores à colheita (BROWN; SWINBURNE, 1971; SENG et al., 1985). O papel importante da fisiologia de frutos na contenção de doenças é evidenciado por experimentos bem sucedidos com tratamento com calor, que já foi estudado como alternativa ao controle de podridões pós colheita (MAXIN et al., 2014). Estudos desse tipo devem ser realizados para o tratamento de *N. ditissima* em maçã no Brasil.

Frutos maduros inoculados com suspensão de conídios sem ferimentos não foram suscetíveis à infecção, indicando a necessidade de ferimentos nesta fase para

que ocorra a doença nos frutos, para as duas cultivares avaliadas (Eva e Gala). Esse resultado corrobora o descrito por Xu e Robinson (2010), que descrevem que infecções pós colheita ocorrem apenas na presença de ferimentos em frutos.

A maçã é um fruto que fica armazenado durante meses (PETRI et al., 2011) e o contato entre frutos com lesões esporulantes e frutos sadios com ferimentos tem potencial de causar aumento na frequência de podridão por *N. ditissima* nas câmaras frias. Isso porque, como evidenciado pelo trabalho, o patógeno possui capacidade de germinação, ainda que baixa, em baixas temperaturas e com pouca umidade. Além disso, testes realizados *in vitro* neste trabalho mostraram que a esporulação em baixas temperaturas, condição em que são mantidos os frutos de maçã no armazenamento, se deu principalmente na forma de macroconídios, que, segundo Zeller (1926) é o principal esporo infectivo em condições de campo. Tendo isso em vista, o rigoroso controle de qualidade de frutos que vão para as câmaras frias deve ser efetuado. Esse controle deve começar a campo, para evitar que frutos com lesões esporulantes sejam colocados em caixas de transporte (Bins), que muitas vezes são utilizadas por mais de uma propriedade produtora, podendo inclusive transportar conídios que ficaram aderidos à superfície dos Bins a propriedades que ainda não possuem o patógeno. Estudos que comprovem a presença e viabilidade de esporos em caixas de transporte de maçãs devem ser realizados no futuro para melhor orientação dos produtores e para evitar a entrada do patógeno em regiões que ainda não o têm.

Além da dependência de umidade na forma de chuva para a disseminação de conídios e ascósporos (WEBER, 2014), ela se mostrou de extrema relevância para a germinação de conídios da fase imperfeita de *N. ditissima in vitro* neste trabalho. Mesmo em temperaturas de 10 a 30 °C, o patógeno apresentou elevada germinação com período de molhamento acima de 12 horas. Isso demonstra o elevado potencial do patógeno para infecção em frutos e ferimentos em troncos e ramos quando se tem condições de umidade elevadas e persistentes a campo. Esse resultado corrobora o que foi evidenciado por Latorre et al. (2002), cujos resultados demonstram que temperaturas de 6 e 32 °C são adequadas para a germinação de conídios, desde que compensadas por maior período de molhamento. No entanto, no presente trabalho encontrou-se elevada porcentagem de germinação *in vitro* em temperatura de 10 °C com período de molhamento de 48 horas, enquanto que os autores citados não encontraram infecção *ex vivo* a 5 °C independentemente do

período de molhamento testado (0 a 46 horas). Com base nisso, ensaios *ex vivo* devem ser conduzidos com os isolados testados nesse trabalho e menores temperaturas. Aliado a isso, estudos da infecção nas condições de armazenamento da maçã devem ser conduzidos para melhor elucidar o impacto desta doença em frutos no período de pós-colheita.

Temperaturas de 10 a 15 °C favoreceram a produção de macroconídios *in vitro* em meio de cultura BDA. Já a temperatura de 30 °C foi limitante à produção de macroconídios, bem como para o crescimento do micélio do patógeno, indicando sua adaptação em temperaturas mais baixas, características de regiões produtoras de maçã que possuem problemas com as doenças causadas por *Neonectria ditissima*.

Exceto para a temperatura de 10 °C, a produção de microconídios foi sempre superior à de macroconídios no meio BDA. A produção de maior número de microconídios em relação à macroconídios em meio de cultura já foi relatada por Scheper et al (2014), que afirmaram que para a maioria dos meios de cultura a maior parte dos isolados da fase imperfeita de *Neonectria ditissima* não consegue produzir conídios, e aqueles que produzem geralmente geram microconídios ao invés dos macroconídios, tipicamente encontrados na natureza. Os autores, que não testaram o meio BDA, ainda recomendam o meio sintético Matsushima (MM) e o Meio Ágar Água com adição de seiva de macieira (ASAWA), para favorecer a produção de macroconídios em maior quantidade. Porém, isolados cultivados e mantidos em meio de cultura BDA se comportaram de forma semelhante quanto à germinação com relação a conídios utilizados por Latorre et al. (2002) que foram cultivados em meio MM. Um estudo mais detalhado em relação aos conídios produzidos pela fase imperfeita de *N. ditissima* em outros meios de cultura podem ser conduzido.

Neonectria ditissima, praga quarentenária A2, foi detectada somente em na região de Palmas no estado do Paraná. No entanto, as condições climáticas de áreas produtoras na Região Metropolitana de Curitiba são semelhantes àsquelas observadas das principais áreas produtoras no estado do Rio Grande do Sul durante a época de colheita, onde já são registrados prejuízos decorrentes da incidência dessa doença em frutos. Portanto, são necessárias medidas eficientes de exclusão do patógeno em áreas do Paraná onde ainda não foram registrados casos da doença.

3.5 CONCLUSÕES

Todos os isolados de *Neonectria ditissima* coletados em diferentes anos causaram sintoma de podridão em frutos da cultivar Gala, apesar de apresentarem diferenças nos tamanhos de lesão.

O patógeno possui melhor crescimento micelial e produção de microconídios em temperaturas superiores à produção de macroconídios. Em altas temperaturas a produção de macroconídios é inibida.

A germinação ocorre mesmo em temperaturas de 10 e 30 °C, contanto que haja molhamento contínuo e persistente.

O período de incubação de *Neonectria ditissima* em frutos destacados das cultivares Gala e Eva são semelhantes, bem como a sensibilidade de ambas as cultivares à doença causada por esse patógeno.

Frutos de maçã das cultivares Eva e Gala em temperaturas simuladas de áreas da Região Metropolitana de Curitiba estão tão sujeitos à infecção por *Neonectria ditissima* quanto aqueles mantidos em temperaturas simuladas das principais áreas produtoras do Rio Grande do Sul.

REFERÊNCIAS

BROWN, A.E.; SWINBURNE, T. R. **Benzoic acid: an antifungal compound formed in Bramley's Seedling apple fruits following infection by *Nectria galligena* Bres.** Physiological Plant Pathology 1, 469–75. 1971.

LATORRE, B.; RIOJA, M; LILLO, C.; MUÑOZ, M. **The effect of temperature and wetness duration on infection and a warning system for European canker (*Nectria galligena*) of apple in chile.** Crop protection, v. 21, n. 4, p. 285-291. 2002.

MAXIN, P; WILLIAMS, M; WEBER, R. W. S. **Control of fungal storage rots of apples by hot-water treatments: a Northern European perspective.** Erw-Obstb 56:25–34. 2014.

PETRI, J. L.; LEITE, G. B.; COUTO, M.; FRANCESCOTTO, P. **Avanços na cultura da macieira no Brasil. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal - SP, Volume Especial, p. 48-56. 2011.**

SCHEPER, R. W. A.; FISHER, B. M.; AMPONSAH, N. T.; WALTER, M. **Effect of culture medium, light and air circulation on sporulation of *Neonectria ditissima*.** New Zealand Plant Protection 67: 123-132. 2014.

SENG, J. M.; SAINDRENAN, P.; BOMPEIX, G. **Induction of *Nectria galligena* mutants resistant to benzoic acid and study of their aggressiveness towards immature apples.** J Gen Microbiol 131:1863–1866. 1985.

WEBER, R. W. S. **Biology and control of the apple canker fungus, *Neonectria ditissima* (syn. *N. galligena*) from a Northwestern European perspective.** Erwerbsobstbau 56: 95-107. 2014.

XU, X-M., ROBINSON, J.D. **Effects of fruit maturity and wetness on the infection of apple fruit by *Neonectria galligena*.** Plant Pathol 59:542–547. 2010.

ZELLER, S. M. **European canker of pomaceous fruit trees.** Oregon Agricultural College Station Bulletin 222: 1–52. 1926.

CAPÍTULO II

SOBREVIVÊNCIA DE PATÓGENOS NA DORMÊNCIA ATÉ APÓS A BROTAÇÃO DA MACIEIRA INDICA RISCO POTENCIAL COMO INÓCULO PRIMÁRIO DE DOENÇAS

RESUMO

Os ramos de macieira são potenciais fontes de inóculo dos patógenos, os quais podem sobreviver nestes, mesmo após períodos de condições ambientais desfavoráveis e/ou tratamentos de inverno. O objetivo deste trabalho foi avaliar a sobrevivência de patógenos em ramos no início da dormência e após os tratamentos de inverno, coletados nas regiões de Campo Largo, Porto Amazonas e Palmas-PR, durante a dormência e depois da brotação. Para tanto, foram coletados ramos de ano, do tipo brindilas, assintomáticos, com aproximadamente 10 cm de comprimento, sendo 12 ramos da parte superior e 12 ramos da parte inferior do dossel, retirados de 10 plantas escolhidas ao acaso, em junho e em setembro. Metade dos ramos foi deixada diretamente (sem desinfestação) em câmara úmida por 30 dias a 25 °C. A outra metade dos ramos foi desinfestada e mantidas em freezer por 12 horas na temperatura de -16 °C pela Técnica de Incubação por Overnight Freezing (ONFIT) e posteriormente mantidas em câmara úmida por 30 dias a 25 °C. A avaliação foi feita utilizando lupa (Zeiss®) e microscópio de luz (Olympus®), realizando a identificação de patógenos por suas estruturas de reprodução (conídios, ascósporos, picnídios ou peritécios). Os patógenos *Neonectria ditissima*, *Colletotrichum* sp. e *Botryosphaeria* sp. apresentaram redução na incidência entre o período de dormência e após a brotação, exceto para *Botryosphaeria* sp. nas propriedades do município de Palmas, que tiveram elevada incidência após a brotação. O patógeno *Neonectria ditissima* não foi encontrado nas duas propriedades avaliadas de Campo Largo e Porto Amazonas. Já no município de Palmas (nas propriedades Palmas 01 e 02), foi o fungo com maior incidência na dormência, superior a 70%, tendo sua frequência reduzida em um terço depois da brotação. Os gêneros *Alternaria* e *Fusarium* não tiveram redução na incidência depois da brotação. Os fungos *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. e *Rhizopus* sp. tiveram incidência média de 47% no período de dormência, em todas as localidades avaliadas, com menor incidência após este período para os ramos coletados após a brotação. Os ramos coletados durante a dormência com ONFIT apresentaram baixa incidência de *Neonectria ditissima*, *Colletotrichum* sp. e *Botryosphaeria* sp., independente da área de coleta, exceto para o gênero *Botryosphaeria* nas propriedades de Palmas. A incidência de *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. e *Rhizopus* sp. reduziu significativamente após ONFIT. Os gêneros *Alternaria* e *Fusarium* tiveram incidência maior após ONFIT nas quatro propriedades avaliadas, exceto para *Fusarium* spp. em Palmas 01. Os ramos coletados após a brotação apresentaram comportamento semelhante ao observado na dormência após ONFIT, mantendo a incidência dos gêneros *Alternaria* e *Fusarium* inalterada pelo tratamento de Overnight Freezing. Na propriedade de Porto Amazonas os ramos apresentaram apenas a incidência dos gêneros *Botryosphaeria*, *Alternaria* e *Fusarium*. O patógeno *Neonectria ditissima*, detectado nas propriedades Palmas 01 e 02, teve incidência reduzida após ONFIT depois da brotação. Comprovou-se a patogenicidade de *Neonectria ditissima*, *Colletotrichum* sp., *Botryosphaeria* sp., *Alternaria* sp. e *Fusarium* sp. isolados dos ramos por meio de inoculação de frutos de maçã da cultivar Gala com disco de BDA com micélio dos patógenos.

Palavras-chave: sobrevivência; patógenos; ramos.

ABSTRACT

Apple tree twigs are potential source of inoculum of pathogens, which can survive on them, even after periods of unfavorable environmental conditions and/or winter treatments. The objective of this work was to evaluate the survival of pathogens on twigs at the beginning of dormancy and after winter treatments, collected in the regions of Campo Largo, Porto Amazonas and Palmas, in Parana state, during dormancy and after bud break. For this, we collected 10-cm-long, asymptomatic twigs, 12 from the upper and 12 from the lower part of the canopy, collected from 10 randomly selected plants, in June and in September. Half of the twigs were put directly (without disinfection) in a humid chamber for 30 days at 25 °C. The other half of the twigs were disinfested and kept in a freezer for 12 hours at -16 °C by the Overnight Freezing Incubation Technique (ONFIT) and then kept in a humid chamber for 30 days at 25 °C. The evaluation was made using a magnifying glass (Zeiss®) and a light microscope (Olympus®), and identification of the pathogens was done by their reproductive structures (conidia, ascospores, pycnidia or perithecia). The pathogens *Neonectria ditissima*, *Colletotrichum* sp. and *Botryosphaeria* sp. showed a reduction in their incidence between dormancy and after bud break, except for *Botryosphaeria* sp. in the properties of the municipality of Palmas, which had a high incidence after bud break. The pathogen *Neonectria ditissima* was not found in both evaluated properties of Campo Largo and Porto Amazonas. In the municipality of Palmas (at Palmas 01 and 02 properties), it was the genera with the highest incidence on dormancy, higher than 70%, and its frequency reduced by one third after bud break. The genera *Alternaria* and *Fusarium* had no reduction in incidence after bud break. *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. and *Rhizopus* sp. had an average incidence of 47% in the dormancy period in all evaluated places, with lower incidence after this period for the twigs collected after bud break. The twigs collected during dormancy with ONFIT presented a low incidence of *Neonectria ditissima*, *Colletotrichum* sp. and *Botryosphaeria* sp., regardless of the collection area, except for the genus *Botryosphaeria* in both Palmas properties. The incidence of *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. and *Rhizopus* sp. reduced significantly after ONFIT. The genera *Alternaria* and *Fusarium* had a higher incidence after ONFIT in all evaluated properties, except for *Fusarium* spp. in Palmas 01. Twigs collected during sprouting presented similar behavior to that observed in dormancy after ONFIT, maintaining the incidence of *Alternaria* and *Fusarium* genera unchanged by the Overnight Freezing treatment. In the property of Porto Amazonas, twigs presented only the genera *Botryosphaeria*, *Alternaria* and *Fusarium*. The pathogen *Neonectria ditissima*, detected in both Palmas properties, had its incidence reduced with the ONFIT after bud break. The pathogenicity of *Neonectria ditissima*, *Colletotrichum* sp., *Botryosphaeria* sp., *Alternaria* sp. and *Fusarium* sp., isolated from the twigs and inoculated on apple fruits of the cultivar Gala with PDA discs with the pathogens mycelium, was confirmed.

Key words: survival; pathogens; twigs.

4 CAPÍTULO II: SOBREVIVÊNCIA DE PATÓGENOS DA DORMÊNCIA ATÉ APÓS A BROTAÇÃO DA MACIEIRA INDICA RISCO POTENCIAL COMO INÓCULO PRIMÁRIO DE DOENÇAS

4.1 INTRODUÇÃO

A macieira é uma frutífera de clima temperado, que se caracteriza pela queda das folhas no final do ciclo e entrada em dormência no inverno. O ciclo anual da macieira compreende dois períodos distintos: repouso e crescimento vegetativo.

No final do ciclo da macieira ocorre a queda das folhas, e as plantas limitam ou cessam seu crescimento, de forma a permitir a sua sobrevivência em baixas temperaturas, iniciando o período de repouso vegetativo ou dormência. O período de repouso vegetativo permite que a planta consiga sobreviver sob frio intenso (PETRI et al., 2006). Durante o repouso vegetativo as atividades metabólicas essenciais continuam a ocorrer, embora com intensidade reduzida. Reações bioquímicas, que são essenciais para iniciar um novo ciclo de crescimento, ocorrem no interior da planta durante a dormência. Essas reações dependem de fatores genéticos e ambientais, que afetam as substâncias reguladoras de crescimento, as quais controlam as trocas metabólicas durante a dormência (PETRI et al., 2006).

A brotação das macieiras ocorre no final do inverno ou início da primavera, dependendo da cultivar, à medida que ocorre aumento da temperatura do ar. Nessa fase, os processos fisiológicos são acelerados sob condições de temperatura e umidade elevadas. A uniformidade da brotação ocorre quando há acúmulo de frio suficiente ou quando é realizado tratamento de superação de dormência (PETRI et al., 2006). Condições meteorológicas exercem grande influência no desenvolvimento, produção e qualidade dos frutos da macieira; as respostas fisiológicas das plantas, como a superação da dormência e a brotação, estão inteiramente relacionadas a elas. Além disso, os elementos climáticos também exercem forte influência sobre a ocorrência e o desenvolvimento de doenças na cultura (FIORAVANÇO et al., 2010).

No período de queda de folhas e frutos de culturas perenes decíduas como a macieira, os micro-organismos têm que suportar longos períodos na ausência de

tecido suscetível; nesse período o patógeno se mantém no pomar em sua fase de sobrevivência, que permite a perpetuação do patógeno nessas situações adversas. A sobrevivência é a fase do ciclo da epidemia que precede a disseminação, sendo, portanto, responsável pela manutenção de inóculo na área (AMORIM; PASCHOLATI, 2011).

A cultura da macieira é acometida por muitas doenças fúngicas, e grande parte dos patógenos causadores de doenças importantes da macieira sobrevive em seus ramos, dentre eles: *Glomerella* sp. (*Colletotrichum* spp.) (JONES e SUTTON, 1996); *Botryosphaeria dothidea* (*Fusicoccum aesculi*) (JONES; ALDWINCKLE, 1990); *Neofabraea malicorticis* e (*Cryptosporiopsis perennans* C. sp.) (GROVE et al., 1992); e *Neonectria ditissima* (*Cylindrocarpon heteronema*) (ZELLER, 1926). Além desses patógenos, também podem sobreviver outros gêneros de fungos de menor importância.

A brotação é o período crítico para ocorrência de infecções por patógenos, como é o caso de *Venturia inaequalis*, causador da sarna da macieira, pois as temperaturas são mais amenas, há grande fluxo de crescimento foliar e liberação acentuada de esporos do fungo; posteriormente, com o desenvolvimento da planta e o aumento das temperaturas médias, começam a se manifestar as doenças de verão, entre elas a podridão branca (*Botryosphaeria* sp.) e a mancha foliar de Glomerela (*Glomerella cingulata*), devido à presença de tecidos suscetíveis (folhas, brotações, flores e frutos) e temperaturas favoráveis (FIORAVANÇO, 2010).

Há poucos trabalhos a respeito da presença de patógenos em ramos de macieira na dormência em áreas produtoras, bem como pouco se conhece a respeito da sobrevivência de patógenos após tratamento de inverno. O levantamento desses patógenos pode auxiliar na avaliação da eficiência desses tratamentos de inverno, bem como prever quais doenças estão com elevada quantidade de inóculo em ramos, com potencial de se tornarem epidêmicas.

Nesse contexto, este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a sobrevivência de patógenos no início da dormência e após os tratamentos de inverno, em ramos tipo brindilas de macieira da cultivar Gala, em regiões produtoras no estado do Paraná. Além disso, objetivou-se verificar diferenças na incidência dos patógenos em ramos com e sem utilização da Técnica de Incubação por Over Night Freezing (ONFIT); e comprovar patogenicidade dos isolados de gêneros de maior importância para a cultura.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Coleta dos ramos

As coletas foram realizadas em quatro propriedades comerciais de macieira duas localizadas no município de Palmas-PR e as outras duas em propriedades localizadas em Campo Largo-PR e Porto Amazonas-PR. As coletas foram realizadas em dois períodos: durante a dormência (antes da realização do tratamento de inverno) e após a brotação (após os tratamentos de inverno).

Com o objetivo de avaliar a presença de patógenos em ramos de macieira foram coletados ramos de ano, do tipo brindilas, assintomáticos, com aproximadamente 10 cm de comprimento, os quais apresentavam gema na parte apical e gemas axilares situadas na inserção das folhas. Em relação ao dossel da planta, foram coletados 12 ramos da parte superior e 12 ramos da parte inferior do dossel, retirados de 10 plantas escolhidas ao acaso nos pomares, totalizando 240 ramos para cada uma das duas épocas de coleta (dormência e após a brotação) e para cada uma das quatro propriedades. No total foram coletados 1920 ramos de macieira avaliados quanto à presença de patógenos.

Metade dos ramos foi deixada diretamente (sem desinfestação) em câmara úmida por 30 dias a 25 °C. A outra metade dos ramos foi desinfestada e mantidas em freezer por 12 horas na temperatura de -16 °C pela Técnica de Incubação por Over Night Freezing (ONFIT) (MICHAILIDES et al., 2000) e posteriormente mantidas em câmara úmida por 30 dias a 25 °C.

A avaliação foi feita utilizando lupa estereoscópica (Zeiss®) e microscópio de luz (Olympus®), realizando a identificação por observação direta ou por meio da realização de lâminas das estruturas de reprodução dos patógenos (conídios, ascósporos, picnídios ou peritécios).

4.2.2 Caracterização das áreas de coleta dos ramos

Os locais de coleta, cultivares, espaçamento entre plantas, idade do pomar e o tipo de polinizadoras utilizadas estão apresentados na TABELA 7. A lista de agrotóxicos usados entre o período da primeira e da segunda coleta está apresentada no Apêndice A. Foram utilizados produtos de diferentes grupos químicos para diferentes patógenos-alvo.

TABELA 7 CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES DE COLETA DOS RAMOS EM RELAÇÃO À LOCALIDADE, CULTIVAR, ESPAÇAMENTO, ANO DE PLANTIO E CULTIVARES POLINIZADORAS.

Local	Cultivar	Espaçamento (m)	Ano do Plantio	Polinizadora
Campo Largo	Imperial Gala	1,20 x 4,0	2005	Imperatriz e Fuji Suprema
Porto Amazonas	Imperial Gala	1,48 x 4,0	1998	Imperatriz e Willi Sharp
Palmas 01	Imperial Gala	1,0 x 4,0	2004	Imperatriz
Palmas 02	Maxi Gala	1,2 x 4,0	2008	Fuji Suprema

A caracterização das condições climáticas entre o período de junho a agosto do ano de 2016 foi obtida de estações meteorológicas do IAPAR (Instituto Agrônomo no Paraná) do município da Lapa – PR representando as localidades de Campo Largo-PR e Porto Amazonas-PR (APÊNDICE B), e de Palmas – PR representando as propriedades Palmas 01 e 02 (APÊNDICE C).

4.2.3 Análise estatística

A comparação de médias do entre os dados foi realizada pelo teste de Skott-Knott ($P < 0,05$). Não foi realizada nenhuma transformação dos dados para as análises nestes experimentos. As análises foram realizadas utilizando o software R (R Core Team).

4.2.4 Teste de patogenicidade em frutos

Para o teste de patogenicidade foram utilizados frutos da cultivar Gala, cuja superfície foi desinfestada pela imersão em álcool 70% durante um minuto, logo em seguida em hipoclorito de sódio a 1% e enxaguados três vezes em água destilada. Para a secagem, os frutos foram mantidos sobre papel toalha durante quatro horas em temperatura ambiente. Estes foram, então, colocados individualmente em potes plásticos contendo papel de filtro umedecido. Na parte superior dos frutos foram feitos dois ferimentos de 3 mm de profundidade com palitos de dente autoclavados. Discos de micélio de 5 mm, extraídos do bordo de colônias de sete dias dos isolados de *N. ditissima* (somente isolado de Palmas), *Colletotrichum* sp., *Botryosphaeria* sp., *Alternaria* sp. e *Fusarium* sp., com o auxílio de um perfurador, foram transferidos para os locais de ferimentos nos frutos. Frutos inoculados com discos de meio de cultura sem as estruturas do patógeno foram utilizados como controle. Após a inoculação os frutos foram acondicionados em prateleiras em sala com temperatura de 25 +- 2° e fotoperíodo de 12 horas. A avaliação foi feita ao 20° dia, por meio da observação dos sintomas nos frutos e sinais dos patógenos. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo para cada isolado de cada região cinco repetições de um fruto com dois ferimentos, totalizando, com os 5 frutos testemunha, 50 frutos.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Presença de patógenos durante a dormência e após brotação em ramos de macieira mantidos em câmara úmida

A incidência média de patógenos em ramos de macieira coletados em diferentes propriedades está apresentada na FIGURA 9. A incidência de patógenos em ramos de macieira mantidos em condições favoráveis de umidade e temperatura resultou em maior incidência no período de dormência quando comparado com após

a brotação, para a maioria dos patógenos. Os patógenos *Neonectria ditissima*, *Colletotrichum* sp. e *Botryosphaeria* sp. apresentaram redução na incidência entre o período de dormência e após brotação, exceto para *Botryosphaeria* sp. nas propriedades do município de Palmas, onde o comportamento foi inverso, sendo que a frequência na brotação foi significativamente maior, atingindo até 80% dos ramos avaliados em Palmas 02 (FIGURA 9).

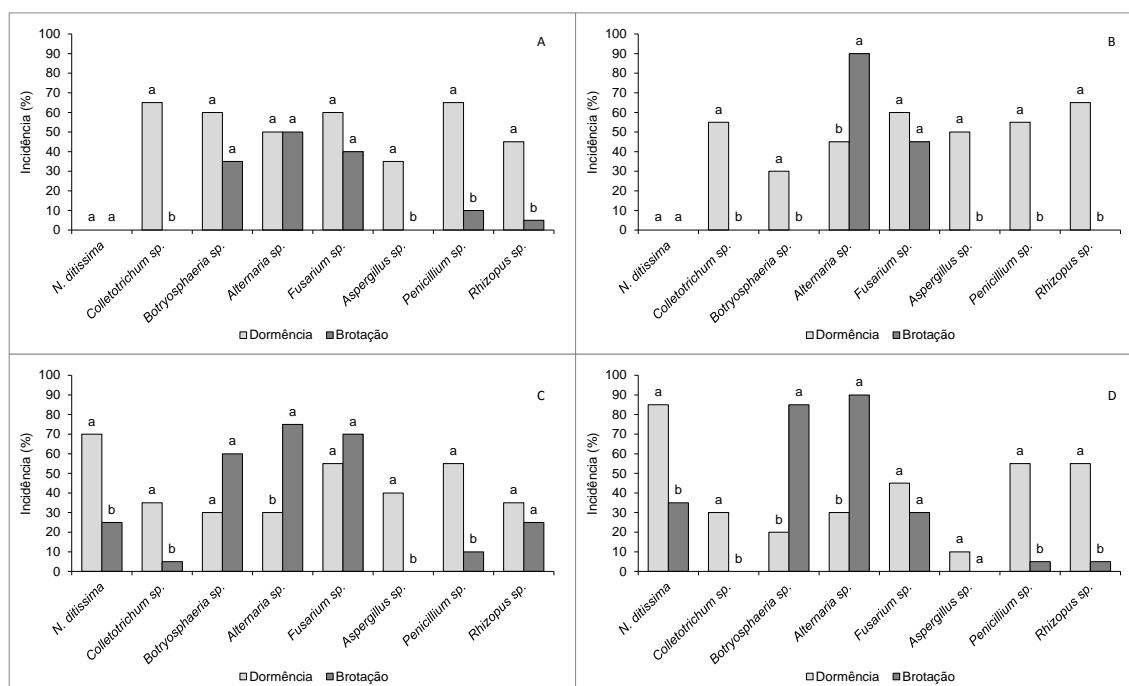


FIGURA 9. INCIDÊNCIA DE GÊNEROS DE FUNGOS EM RAMOS DE MACIEIRA 'GALA', TIPO BRINDILAS, COLETADAS NOS PERÍODOS DE DORMÊNCIA E APÓS BROTAÇÃO NOS MUNICÍPIOS DE CAMPO LARGO-PR (A), PORTO AMAZONAS-PR (B), PALMAS-PR 01 (C), PALMAS-PR 02 (D), INCUBADOS EM CÂMARA ÚMIDA. Médias de cada patógeno com a mesma letra não diferem pelo teste de Skott-Knott a 5% de propabilidade ($P < 0,05$)

O patógeno *Neonectria ditissima* não foi encontrado na Região Metropolitana de Curitiba, nas duas propriedades avaliadas Campo Largo e Porto Amazonas. Já no município de Palmas (nas propriedades Palmas 01 e 02), foi o fungo com maior incidência na dormência, superior a 70%, tendo sua frequência reduzida em um terço após a brotação (FIGURA 9).

Em Campo Largo, Porto Amazonas e Palmas 02, o gênero *Colletotrichum* teve frequência acima de 30 % na coleta realizada na dormência, enquanto após a brotação não foi encontrada nenhuma estrutura do patógeno nos ramos avaliados

(Figura 9A, 9B e 9D); mesmo em Palmas 01 houve redução significativa da coleta durante a dormência, com frequência inferior a 10% (FIGURA 9)

Diferentemente dos gêneros anteriores, para os gêneros *Alternaria* e *Fusarium*, de forma geral, não houve redução na incidência dos patógenos depois da brotação. Para a *Alternaria* sp. após brotação a incidência atingiu 90% em Porto Amazonas, mais que dobrou em Palmas 01 e Palmas 02, e manteve-se na mesma proporção com alta incidência (50%) em Campo Largo. Já a incidência de *Fusarium* manteve-se sem diferenças entre as duas épocas de coleta, com incidência média de 50% (FIGURA 9).

Os gêneros de fungos *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. e *Rhizopus* sp. tiveram incidência média de 47% no período de dormência, em todas as localidades avaliadas, com menor incidência após este período para os ramos coletados após brotação.

4.3.2 Efeito da Técnica de Incubação por Over Night Freezing (ONFIT) na presença de patógenos em ramos de macieira coletados na dormência e após brotação

Os ramos coletados durante a dormência com ONFIT apresentaram baixa incidência de *Neonectria ditissima*, *Colletotrichum* sp. e *Botryosphaeria* sp., independente da área de coleta, exceto para o gênero *Botryosphaeria* nas propriedades de Palmas, que apresentou a mesma incidência independente da realização do ONFIT (FIGURA 10).

A incidência dos gêneros *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. e *Rhizopus* sp. reduziu significativamente após ONFIT. Os gêneros *Alternaria* e *Fusarium* tiveram incidência maior após ONFIT nas quatro propriedades avaliadas, exceto para *Fusarium* spp. em Palmas 01 (FIGURA 10).

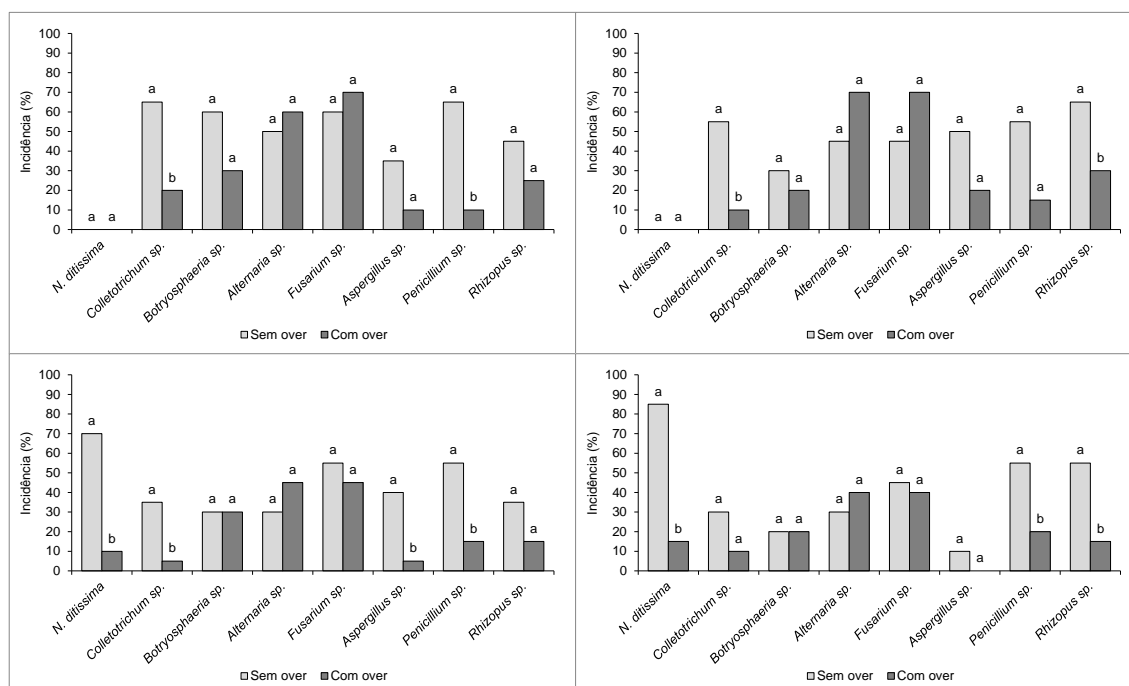


FIGURA 10. INCIDÊNCIA DE GÊNEROS DE FUNGOS EM BRINDILAS DE MACIEIRA DA CULTIVAR GALA COLETADAS NO PERÍODO DE DORMÊNCIA NOS MUNICÍPIOS DE CAMPO LARGO-PR (A), PORTO AMAZONAS-PR (B), PALMAS-PR 01 (C) E PALMAS-PR 02 (D), INCUBADOS EM CÂMARA ÚMIDA, COM E SEM TÉCNICA DE INCUBAÇÃO POR OVER NIGHT FREEZING (ONFIT) (15 HORAS A -16°C). Médias de cada patógeno com a mesma letra não diferem pelo teste de Skott-Knott a 5% de propabilidade ($P < 0,05$)

Os ramos coletados após a brotação apresentaram comportamento semelhante ao observado na dormência após ONFIT, mantendo a incidência dos gêneros *Alternaria* e *Fusarium* inalterada pelo tratamento de Overnight Freezing. Na propriedade de Porto Amazonas os ramos apresentaram apenas a incidência de três gêneros *Botryosphaeria*, *Alternaria* e *Fusarium* (FIGURA 11).

Assim como o observado na dormência, o patógeno *Neonectria ditissima*, detectado nas propriedades Palmas 01 e 02, reduziu a incidência após ONFIT (FIGURA 11).

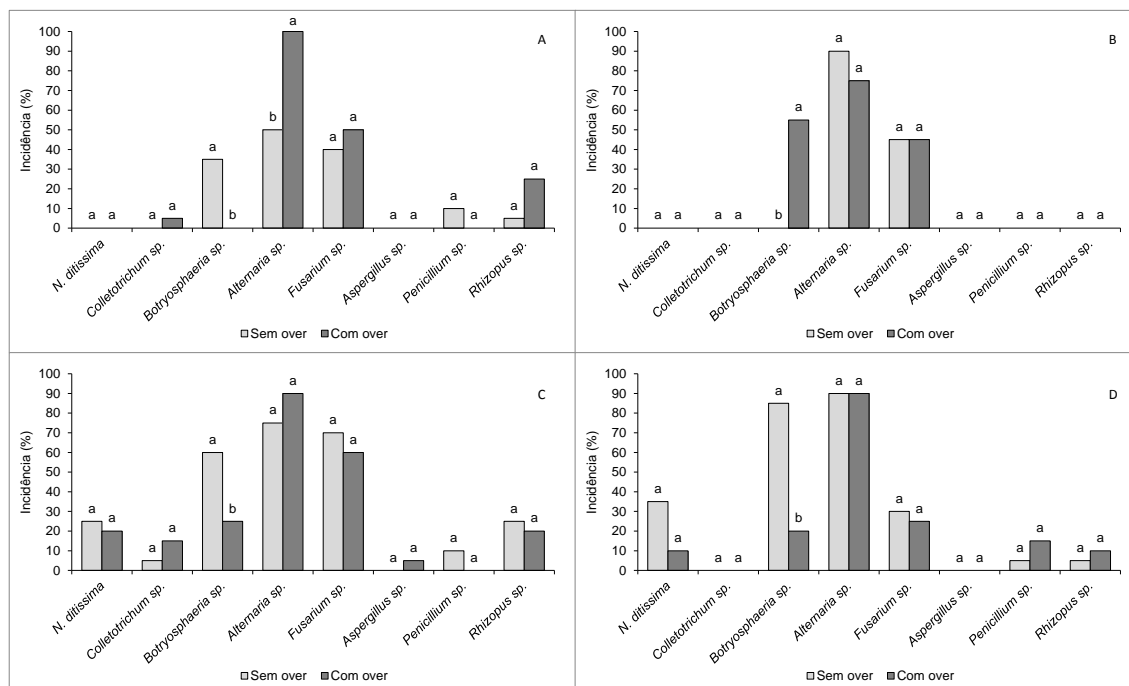


FIGURA 11. INCIDÊNCIA DE GÊNEROS DE FUNGOS EM BRINDILAS DE MACIEIRA DA CULTIVAR GALA COLETADAS APÓS A BROTAÇÃO NOS MUNICÍPIOS DE CAMPO LARGO-PR (A), PORTO AMAZONAS-PR (B), PALMAS-PR 01 (C) E PALMAS-PR 02 (D), INCUBADOS EM CÂMARA ÚMIDA, COM E SEM TÉCNICA DE INCUBAÇÃO POR OVER NIGHT FREEZING (ONFIT) (15 HORAS A -16 °C). Médias de cada patógeno com a mesma letra não diferem pelo teste Skott-Knot a 5% de propabilidade (P<0,05)

O gênero *Colletotrichum* spp. teve incidência muito baixa com e sem ONFIT, não sendo constatado em Porto Amazonas e Palmas 02. *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. e *Rhizopus* sp. apresentaram baixa incidência durante esta fase, sem efeito da ONFIT (FIGURA 11).

4.3.3 Teste de patogenicidade dos principais patógenos detectados e isolados de ramos de macieira em frutos da cultivar Gala

A inoculação dos isolados de *Neonectria ditissima*, *Colletotrichum* sp., *Botryosphaeria* sp., *Alternaria* sp. e *Fusarium* sp. resultou em sintomas nos frutos, que estão expostos no Apêndice D.

4.4 DISCUSSÃO

Vários patógenos importantes para cultura, como *Neonectria ditissima*, *Colletotrichum* sp., *Botryosphaeria* sp., *Alternaria* sp. e *Fusarium* sp. foram detectados tanto no início da dormência como após os tratamentos de inverno, indicando o alto potencial de inóculo primário para o início do desenvolvimento da doença em ambas regiões amostradas no Paraná. Além disso alguns destes patógenos (*Alternaria* e *Fusarium*), não tem sido alvo para o controle durante esta fase, o que indica risco para uma epidemia futura. A presença de *Neonectria ditissima* foi confirmada em ramos das duas propriedades do município de Palmas (Palmas 01 e 02). Nos ramos coletados em propriedades de Campo Largo e Porto Amazonas não foi encontrada nenhuma estrutura desse fungo, indicativo de sua ausência nos ramos destas propriedades.

No Brasil, a instrução normativa nº 12 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) de 23 de maio de 2014 alterou o status do patógeno *Neonectria ditissima* de A1 (Praga Quarentenária Ausente) para A2 (Praga Quarentenária Presente). Medidas extremamente rigorosas baseadas no método de exclusão do patógeno em regiões nas quais o patógeno ainda não foi detectado devem ser tomadas. Já foram constatados casos no Brasil na maior parte das regiões produtoras do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, porém no Paraná a doença está ainda supostamente restrita à região de Palmas.

Independente da época de coleta dos ramos nas duas propriedades do município de Palmas foi encontrado apenas a fase perfeita de *N. ditissima*. Apesar de os ramos terem sido coletados sem sintomas, havia sido observada grande quantidade de cancrios de *N. ditissima* nos demais ramos da planta de coleta. Os sinais de *N. ditissima* na forma de peritécio foram detectados nos ramos avaliados aos 30 dias. Mesmo estando o fungo latente, este curto período de tempo foi suficiente para a produção destas estruturas pelo patógeno, o que vem ao encontro de resultados de Mendes et al. (2014), que observaram produção de peritécios em ramos destacados em apenas 25 dias. Apesar da menor incidência de *N. ditissima* ter sido detectada após brotação, os resultados demonstram a alta capacidade do patógeno em produzir grande quantidade de inóculo em curto período de tempo, servindo de fonte de inóculo principalmente nesta fase da macieira, quando as

estruturas florais são altamente suscetíveis a infecções pelo patógeno. Pode, também, vir a ser fonte de inóculo para infecções em ramos e frutos de macieira.

A redução na incidência de *N. ditissima*, depois da brotação, pode ser explicada pela poda de inverno, que é uma das bases do controle do Cancro Europeu quando a retirada dos ramos sintomáticos é facilitada pela melhor visualização dos cancrios nesse período (WEBER, 2014), somada à utilização de fungicidas cúpricos e outros fungicidas como Tiofanato Metílico e Captana, registrados na Agência de Defesa Agropecuária do Paraná (ADAPAR) para controle da doença, os quais contribuíram para a redução na incidência do patógeno entre a dormência até após a brotação. A utilização desses fungicidas, porém, não foi totalmente eficaz, visto que a incidência na coleta após a brotação ainda ultrapassa os 30%, provavelmente devido à elevada incidência da doença nos pomares. Portanto, as medidas de controle utilizadas não foram suficientes para a retirada do inóculo de *Neonectria ditissima* na área, e estas devem ser complementadas para reduzir as perdas registradas com esta doença em pomares de macieira.

Em todos os locais de coleta houve drástica redução da incidência do gênero *Colletotrichum*. A importância das doenças causadas por esse gênero em macieira resulta de sua ampla distribuição (LEITE et al., 1988, BONETTI et al., 1999), da grande quantidade de dano, que pode variar de 50 a 75% (CEREZINE et al., 1992; MULLER et al., 1993), e da grande quantidade de pulverização com fungicidas (10 a 12 por estação) necessárias para o seu controle (CEREZINE et al., 1992). Crusius et al. (2002) relataram que a sobrevivência de *Colletotrichum* spp. ocorreu na macieira dormente, sendo que, enquanto isolados obtidos de folhas caídas no solo e frutos mumificados induziram sintomas de podridão amarga nos frutos, somente isolados obtidos de ramos e gemas causaram mancha foliar de Glomerella. A aplicação de fungicidas no inverno não erradicou o inóculo primário do fungo em experimento realizado por Crusius et al. (2002). Duas pulverizações de oxicloreto de cobre a 0,3% reduziram o inóculo inicial do fungo em 65-84,6% em gemas e 85,6-93,7% em ramos. A redução do inóculo inicial também foi encontrada no presente trabalho, inclusive não havendo incidência do gênero em três das quatro propriedades onde foi realizada coleta de ramos após a brotação, o que pode ser resultado do tratamento de inverno realizado duas vezes na dormência com fungicidas cúpricos (sulfato de cobre e oxicloreto de cobre) em todas as propriedades. Apesar dos resultados encontrados, é importante ressaltar que essa

redução do inóculo em ramos não significa que não ocorrerá doença, visto que Crusius et al. (2002) não encontraram diferença na incidência inicial da doença entre plantas pulverizadas e não pulverizadas, indicando que mesmo quantidades mínimas de inóculo podem levar a epidemias de mancha foliar de *Glomerella*.

Nas áreas de coleta em Palmas, a incidência do gênero *Botryosphaeria* aumentou da dormência para depois da brotação, provavelmente devido ao aumento de temperatura que favorece o desenvolvimento e maturação dos picnídios com conídios, corroborando os resultados encontrados por Copes e Hendrix (2004) para temperaturas de produção de conídios de *Botryosphaeria dothidea*, espécie mais comumente isolada de macieiras, que variam de 6 a 30 °C, porém com pico ótimo de produção a 24 °C, temperatura próxima àquelas observadas após brotação nas áreas de coleta.

Folhas do dossel, resíduos de folhas no solo, ramos e brotos são fontes de inóculo de *Alternaria* spp. (SAWAMURA; YANASE, 1964; TANAKA et al., 1989; HARTEVELD et al., 2014). A sobrevivência do inóculo de *Alternaria* spp. em ramos desempenha papéis significativos formação de doenças causadas por esse patógeno em pêssago e damasco (YOUSEFI E SHAHRI, 2009) e a sobrevivência de *A. alternata* foi relatada em gemas sendo fonte de inóculo para a infecção e morte de gemas floríferas de peras (WENNEKER et al. Al., 2011). Estudos de Hartveld et al. (2013) indicam que, apesar do resíduo foliar fornecer a maior quantidade de inóculo de *Alternaria* spp. no pomar de maçã ao longo do ano, a importância e contribuição de outras partes da planta para o inóculo no pomar não deve ser subestimada sendo que no inverno os ramos e gemas estão disponíveis. Esses autores também constataram que, com relação aos fatores climáticos, a umidade relativa dos ramos foi o fator que mais influenciou a dinâmica da produção de esporos, sendo a umidade relativa resultado da combinação de precipitação e de alta temperatura. A produção de esporos em ramos é reduzida com alta precipitação, mas o aumento da temperatura após a precipitação aumenta a umidade relativa, consequentemente, para aumentar a produção de esporos. A umidade relativa foi indicada como um fator que fortemente influencia a esporulação e a infecção de *Alternaria* spp. (ROTEM, 1994) e a incidência da mancha foliar de *Alternaria* (THAKUR E NIRUPMA, 2010; YOON ET AL., 1989). A elevação da temperatura após brotação, juntamente com a pluviosidade, pode ter gerado as condições ideais para a esporulação do patógeno nos ramos. Além disso, o

tratamento de inverno em todas as propriedades não foi direcionado a *Alternaria* spp., e sim a outros fungos de maior importância para a cultura no estado do Paraná, principalmente a *Colletotrichum* spp. As paredes do conídio da *Alternaria* spp são geralmente mais espessas e por ser formada de várias células, o que também pode ser fator relacionado à elevada incidência mesmo após tratamento de inverno. Esse fato foi evidenciado por Kim et al. (2017), que encontrou em isolados de *Alternaria alternata* resistentes ao fungicida Iprodione, do grupo químico carboximida, alterações celulares visíveis durante a esporulação, formando conídios multicelulares com paredes celulares duplas (espessadas) e acúmulo de corpos lipídicos proliferados no citoplasma, o que pode inibir a penetração do fungicida nas células conidiais, reduzindo a eficiência do fungicida, e que podem também ser utilizados como fontes energéticas e nutricionais pelo fungo.

Existem mais de 70 espécies do gênero *Fusarium* presentes em diversas regiões do mundo (LESLIE; SUMMERELL, 2006), seja como colonizadores da rizosfera, endofíticos ou patógenos. O fungo *Fusarium avenaceum* foi identificado como o agente causal da podridão carpelar de maçã (SCHROERS et al., 2008). Essa doença representa um problema econômico potencial para os produtores de maçã, e um problema de segurança para os consumidores devido à produção potencial de micotoxinas durante as infecções, especialmente para a produção de suco de maçã e cidra, visto que maçãs infectadas dificilmente apresentam sintomas externos, o que dificulta sua remoção no processamento (SORENSEN et al., 2009). Além disso, outras espécies do gênero *Fusarium* já foram relatadas formando cancrios em ramos em outros gêneros de plantas cultivadas, como *Fusarium lateritium* em aveleira (*Corylus avellana* L.) (BELISARIO et al., 2005), *Fusarium solani* em noqueira (*Juglans regia* L.) (CHEN; SWART, 2000) e em em carvalho americano (*Quercus rubra* L.) (VUJANOVIC et al., 1999), *Fusarium circinatum* em espécies de pinheiros (*Pinus halepensis* e *P. pinea*) (CARLUCCI et al., 2007). Wang et al. (2009) relataram grave problema em plantas de jambo-rosa, com declínio rápido e morte destas, cujo agente causal foi identificado como sendo *Fusarium solani*. Estudos a respeito do gênero em macieira devem ser realizados para melhor compreensão do patossistema.

Os gêneros *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. e *Rhizopus* sp são importantes causadores de doenças da pós colheita em maçãs. Durante a infecção no hospedeiro, esses microrganismos produzem enzimas de degradação da parede

celular que atacam a parede celular da fruta, especialmente a pectina, a hemicelulose e a celulose (BRETT E WALDRON, 1996).

O gênero *Penicillium* spp. é causador do bolor azul em maçãs, uma das mais importantes doenças de armazenamento no mundo (HOLMES, 1990). Embora possa se comportar como um patógeno latente (BIGGS, 1995), ele é geralmente considerado um patógeno de fermento (AMIRI; BOMPEIX, 2005). Devido às diferenças entre as espécies de *Penicillium*, a doença é geralmente atribuída a *P. expansum* (JANISIEWICZ, 1999), embora também haja relatos de outras espécies causando a doença, como *P. verrucosum* (PENROSE et al., 1984), *P. solitum* (HOLMES, 1990) e *P. griseofulvum* (SPADARO et al., 2011). Seu inóculo é encontrado no solo e nas superfícies das plantas (SANDERS; SPOTTS, 1995), como demonstrado no presente trabalho em ramos.

A podridão de *Aspergillus* é uma das mais importantes doenças pós-colheita em maçãs durante o armazenamento (GHERBAWY, 1998; AL-BACHIR, 1999). Várias espécies de *Aspergillus* foram isoladas de tecidos de frutos mostrando os sintomas de podridão de *Aspergillus*. Entre eles, o *Aspergillus niger* é conhecido por causar os sintomas mais graves (HASAN, 2000; ZAHAVI et al., 2000).

Rhizopus spp. também são fungos causadores de enormes perdas em frutas, causando podridões em armazenamento (OGAWA, 1995). Os esporos de *Rhizopus* spp. são muito comuns na atmosfera e esta infecção de frutos ocorre principalmente em fermentos durante a colheita ou embalagem.

No presente trabalho, esses gêneros de fungos tiveram elevada incidência na época da dormência, com redução de incidência em todas as localidades avaliadas após a brotação, com destaque a Porto Amazonas, na qual não houve incidência desses gêneros. Isso aconteceu provavelmente devido ao tratamento de inverno com fungicidas cúpricos, os quais, por serem de ação multissítio, possuem capacidade de reduzir o inóculo desses patógenos nos ramos, evitando o aparecimento de podridões pós-colheita durante o armazenamento.

Em nenhum dos 1920 ramos analisados foi detectado sinais de *Venturia inaequalis*, agente causal da Sarna da macieira. Apesar da importância epidêmica desta doença nos pomares desta cultura, este fato pode ser explicado em parte pela principal forma de sobrevivência deste patógeno, que ocorre principalmente em resíduos de folhas no solo, somada as condições climáticas que não são adequadas para seu desenvolvimento nas regiões avaliadas.

A desinfestação e o congelamento dos ramos pelo ONFIT, que deteriora os micro-organismos superficiais e degrada as células dos tecidos externos dos ramos, de forma geral reduziram a incidência dos gêneros de fungos ou não diferiram em relação a não utilização da técnica, tanto na dormência quanto após a brotação, o que evidencia que os patógenos, de forma geral, estão sobrevivendo mais superficialmente nos ramos. O gênero *Alternaria*, que apresentou índices muito elevados de incidência na coleta após a brotação sem ONFIT, também os apresentou acima dos 70% após a utilização da técnica em todas as localidades, tendo inclusive chegado a 90% nos ramos coletados na região de Campo Largo, indicativo de que o patógeno consegue sobreviver mesmo em temperaturas extremamente baixas, provavelmente devido à sua característica de estrutura celular com paredes espessas, e pode estar sobrevivendo em tecidos mais internos nos ramos.

4.5 CONCLUSÕES

Foram detectados em ramos de macieira coletados na dormência e após a brotação diversos gêneros de fungos patogênicos: *Neonectria ditissima*, *Colletotrichum* sp., *Botryosphaeria* sp., *Alternaria* sp. e *Fusarium* sp. Além destes, foram encontrados no período da dormência gêneros de fungos *Aspergillus*, *Penicillium* e *Rhizopus*, causadores de podridões pós colheita.

O patógeno *Neonectria ditissima*, presente apenas nas áreas de Palmas – PR, sobrevive em ramos tipo brindilas de macieira mesmo após os tratamentos de inverno, sendo potencial fonte de inóculo para a infecção depois da brotação.

A elevada incidência dos gêneros *Botryosphaeria*, *Alternaria* e *Fusarium* após a brotação demonstra falha no controle e grande potencial de causar epidemias na região de Palmas – PR.

Os ramos são fonte de inóculo para infecções de frutos por *Neonectria ditissima*, *Colletotrichum* sp., *Botryosphaeria* sp., *Alternaria* sp. e *Fusarium* sp se até o período de frutificação não tiver sido realizado controle.

Os patógenos, de forma geral, sobrevivem superficialmente nos ramos, como evidenciado pela utilização de ONFIT.

REFERÊNCIAS

- AL-BACHIR, M. **Effect of gamma irradiation on storability of apples (*Malus domestica* L.)**. Plant Foods Hum. Nutr. 54, 1 /11. 1999.
- AMIRI, A.; BOMPEIX, G. **Diversity and population dynamics of *Penicillium* spp. on apples in pre- and postharvest environments: consequences for decay development**. Plant Pathol. 54, 74–81. 2005.
- AMORIM, L.; PASCHOLATI, S. F. Ciclo das relações planta- patógeno. In: **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 4 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, cap. 4, p. 59-100. 2011.
- BELISARIO, A.; MACCARONI, M.; CORAMUSI, A. **First report of twig canker of hazelnut caused by *Fusarium lateritium* in Italy**. Plant Dis. 89:106. 2005.
- BIGGS, A. R. **Detection of latent infections in apple fruit with paraquat**. Plant Disease 79, 1062–7. 1995.
- BONETTI, J. I. S.; RIBEIRO, L. G.; KATSURAYAMA, Y. **Manual de identificação de doenças e pragas da macieira**. Florianópolis, Epagri. 1999.
- BRETT, C.T.; WALDRON, K.W. **Physiology and Biochemistry of Plant Cell Walls**. Cambridge University Press, London. 1996.
- CARLUCCI, A.; COLATRUGLIO, L.; FRISULLO, S. **First report of pitch canker caused by *Fusarium circinatum* on *Pinus halepensis* and *P. pinea* in Apulia (Southern Italy)**. Plant Dis. 91:1683-1683. 2007.
- CEREZINE, P. C.; LEITE, R. P.; TSUNETTA, M. **Efeito de tratamentos químicos no controle da mancha foliar de *Glomerella* em macieira, no estado do Paraná**. Fitopatologia Brasileira 17:258-267. 1992.
- CHEN, W.; SWART, W. J. **First report of stem canker of English walnut caused by *Fusarium solani* in South Africa**. Plant Dis. 84:592. 2000.
- COPES, W. E.; HENDRIX, F. F. **Effect of temperature on sporulation of *Botryosphaeria dothidea*, *B. obtusa*, and *B. rhodina***. Plant Dis. 88:292-296. 2004.

CRUSIUS, L. U.; FORCELINI, C. A.; SANHUEZA, R. M. V.; FERNANDES, J. M. C. **Epidemiology of apple leaf spot**. Fitopatologia Brasileira 27:065-070. 2002.

DENNIS, J. F. G. Flowering, pollination and fruit set and development. In: **Apples, botany, production and uses**. FERREE, D. C.; WARRINGTON, I. J. Wallingford, VK, p. 156 – 166. 2003.

KIM, E.; LEE, H. M.; KIM, Y. H. **Morphogenetic Alterations of *Alternaria alternata* Exposed to Dicarboximide Fungicide, Iprodione**. Plant Pathol. J. 33(1) : 95-100. 2017.

FIORANVAÇO, J. C.; CZERMAINSKI, A. B. C.; ALVES, S. A. M.; NACHTIGALL, G. R. **Condições meteorológicas e sua influência na safra de maçã 2009/10 na região de Vacaria, RS**. Comunicado Técnico 100. Bento Gonçalves. 8 p. 2010.

GHERBAWY, Y. A. M. H. **Effect of gamma irradiation on the production of cell wall degrading enzymes by *Aspergillus niger***. Int. J. Food Microbiol. 40, 127/131. 1998.

HARTEVELD, D. O. C.; AKINSANMI, O. A.; DRENT, A. **Multiple *Alternaria* species groups are associated with leaf blotch and fruit spot diseases of apple in Australia**. Plant Pathol 62:289–297. 2013.

HASAN, H. A. H. **Patulin and aflatoxin in brown rot lesion of apple fruit and their regulation**. World J. Microbiol. Biotechnol. 16, 607/612. 2000.

HOLMES R. **An Analysis of Post-Harvest Losses in the Victorian Pome Fruit Industry**. Report no. 115. Victoria, Australia: Department of Agricultural and Rural Affairs. 1990.

OGAWA, J.M.; ZEHR, E.I.; BIRD, G.W.; RITCHIE, D.F.; URIU, K.; UYEMOTO, J.K. (Eds.), **Compendium of Stone Fruit Diseases**, APS, St. Paul, MN p. 98. 1995.

JANISIEWICZ, W. **Blue mold, *Penicillium* spp.** Fruit Disease Focus, [<http://www.caf.wvu.edu/kearneysville/>]. 1999.

LEITE, R. P.; TSUNETTA, M.; KISHINO, A.Y. **Ocorrência de mancha foliar de *Glomerella* em macieira no Estado do Paraná.** Curitiba. Iapar. Informe de Pesquisa 81. 1988.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The *Fusarium* laboratory manual.** Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd. p. 388. 2006.

MENDES, R.; NUNES, C. C.; LIMA, F. V.; SILVA, V. C.; ALVES, S. A. M. Efeito da temperatura na produção de conídios e peritécios de *Neonectria ditissima* em ramos destacados de macieira. In: encontro de iniciação científica da Embrapa Uva e Vinho, 12., Bento Gonçalves. **Resumos...** Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho. p. 22. 2014.

MICHAILIDES, T. J.; MORGAN, D. P.; FELTS, D. **Detection and significance of symptomless latent infection of *Monilinia fructicola* in California stone fruit.**(Abstr.) Phytopathology 90:S48. 2000.

MULLER, G., FIOREZE, D.; FORCELINI, C. A. **Evolução da mancha necrótica da folha da macieira em Passo Fundo, RS.** Fitopatologia Brasileira. 18:298. (Resumo). 1993.

PENROSE L. J., NICHOLLS M. R.; JAMES L. **The relative importance of *Penicillium verrucosum* and *P. expansum* as the cause of blue mould and their reaction to benomyl.** In: Biology Branch Plant Diseases Survey (1982–83). Australia: New South Wales Department of Agriculture, 15–7. 1984.

PETRI, J. L.; PALLADINI, L. A.; POLA, A. C. Dormência e indução da macieira. In: EPAGRI. **A cultura da macieira.** Florianópolis, p.261-298. 2006.

WANG, P.H.; CHEN, Y. S.; LIN, M. J.; TSOU, Y. J.; KO, W. H. **Severe decline of wax apple trees caused by *Fusarium solani* in northern Taiwan.** Botanical Studies. 51: 75-80. 2010.

ROTEM, J. **The Genera *Alternaria*: Biology, Epidemiology, and Pathogenicity.** American Phytopathological Society (APS) Press, St. Paul, MN, USA. 1994.

SANDERSON, P. G.; SPOTTS, R. A. **Postharvest decay of winter pear and apple fruit caused by species of *Penicillium*.** Phytopathology 85, 103–10. 1995.

SANHUEZA, R. M. V.; BECKER, W. F.; BONETI, J. I. S.; KATSURAYAMA, Y.; CZERMAINSKI, A. B. C. Características e controle das doenças de verão na produção integrada de maçã. In: SANHUEZA, R.M.V.et al. **Manejo da macieira no sistema de produção integrada de frutas**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, Cap.4, p.51-60. 2006.

SAWAMURA, K.; YANASE, H. Studies on spotted diseases of apples on host penetration of *Alternaria mali* Roberts. Bull. Hortic. Res. Stn. 2, 69e74. 1964.

SCHROERS, H.-J.; SØRENSEN, J. L.; THRANE, U.; NIELSEN, K. F.; JERJAV, M.; MUNDA, A.; FRANK, J. **High incidence of *Fusarium avenaceum* (Ascomycota, Nectriaceae, Gibberella) and moniliformin in apples showing wet core rot symptoms**. Abstract of 9th International Congress of Plant Pathology; Aug 24-29; Torino, Italy. J. Plant Pathol. 90, S2, 326. 2008.

SPADARO D, LORÈ A, AMATULLI MT, GARIBALDI A, GULLINO ML. **First Report of *Penicillium griseofulvum* Causing Blue Mold on Stored Apples in Italy (Piedmont)**. Plant Dis. 95:76. 2011.

TANAKA, S.; SHIMOMURA, S.; TAKASHIMA, E.; KATUMOTO, K.; NISHI, Y. **Occurrence of Fungicide-resistant Strains of *Alternaria mali* in Tokusa Ato-Cho Yamaguchi Prefecture Japan**. Bulletin of the Faculty of Agriculture Yamaguchi University, pp. 49-60. 1989.

THAKUR, V.S.; NIRUPMA, S. 2010. **Epidemic outbreak of apple blotch disease: epidemiology and management in Himachal Pradesh**. Indian Phytopathol. 63, 141e144.

VUJANOVIC, V.; COGLIASTRO, A.; ST-ARNAUD, M.; NEUMANN, P.; GAGNON, D. **First report of *Fusarium solani* canker and wilt symptoms on red oak (*Quercus rubra*) in Quebec, Canada**. Plant Dis. 83:78. 1999.

WENNEKER, M.; JOOSTEN, N.; ANBERGEN, R.; VINK, P.; BRUGGEN, A.S.V. **Epidemiology and effective control of *Alternaria alternata*, causal agent of dead (dormant) flower bud disease of pear**. In: Sanchez, E.E., Sugar, D., Webster, A.D. (Eds.), Acta Horticulturae, XI International Pear Symposium. International Society for Horticultural Science, pp. 485e490. 2011.

YOON, J.T.; LEE, J.T.; PARK, S.D.; PARK, D.O. **Effects of meteorological factors on the occurrence of *Alternaria* leaf blotch caused by *Alternaria alternata* f.sp. *mali***. Korean J. Plant Pathol. 5, 312e316. 1989.

YOUSEFI, A.; SHAHRI, M.H. **Brown spot disease of peach and apricot trees, pathogenicity and overwinter**. Asian J. Plant Pathol. 3, 61e69. 2009.

ZAHAVI, T., COWEN, L., WEISS, B., SCHENA, L., DANS, A., KAPLUNOV, T., ZUTKHI, J., BEN-ARIE, R., DROBY, S. **Biological control of Botrytis, Aspergillus and Rhizopus rot on table and wine grapes in Israel**. Postharvest Biol. Technol. 20, 115/124. 2000.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nas regiões produtoras de macieira ainda isentas da presença de *Neonectria ditissima*, como por exemplo, nos pomares analisados do PR, em Porto Amazonas e Campo Largo, medidas de controle de exclusão do patógeno devem ser intensificadas, visto que as condições climáticas de temperatura não diferem das observadas no estado do RS, que registra grandes prejuízos pela presença do patógeno.

Nas áreas onde *N. ditissima* já está presente, ou ainda em relação aos demais patógenos da macieira, os ramos são fonte de inóculo primária importante após a brotação e ao longo do ciclo desta cultura, mesmo após o período de dormência e/ou tratamentos de inverno. A produção de estruturas reprodutivas se dá em curto período de tempo, mesmo quando presentes de forma dormente, sendo necessária a realização do controle destes patógenos durante esta fase, e nas subseqüentes altamente suscetíveis a infecções como durante a floração e início de formação dos frutos.

As principais cultivares de macieiras produzidas no estado do Paraná, Gala e Eva, são igualmente suscetíveis para infecções por *N. ditissima*, sendo necessários estudos futuros com relação à suscetibilidade a este patógeno pelas demais cultivares com potencial de produção na região como por exemplo as cultivares Fuji e Monalisa.

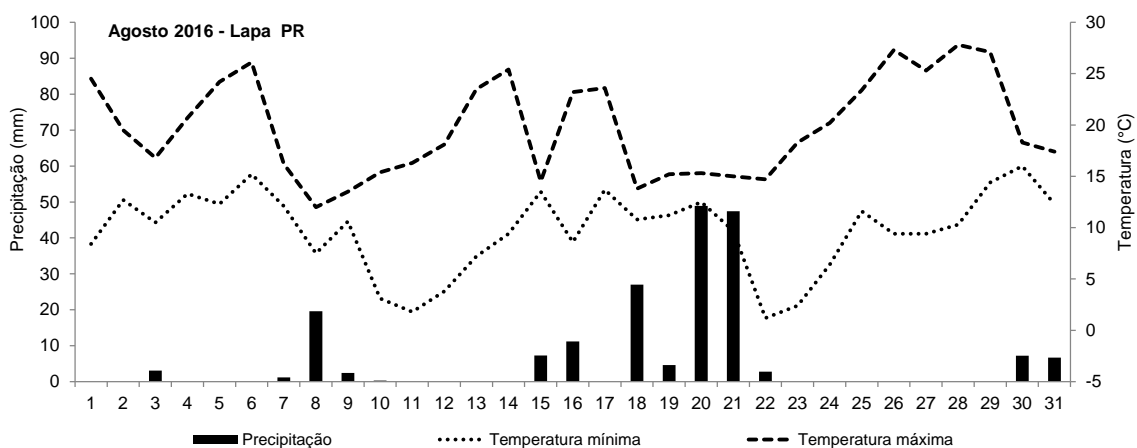
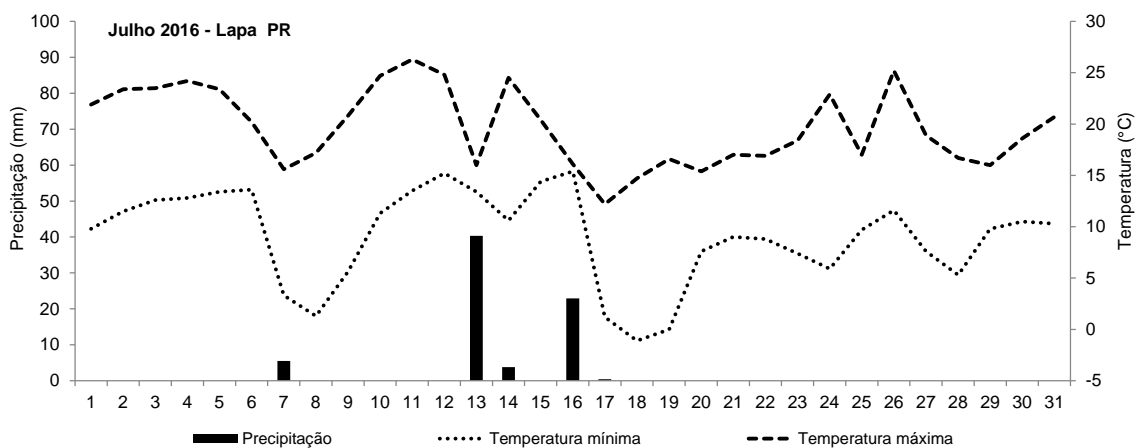
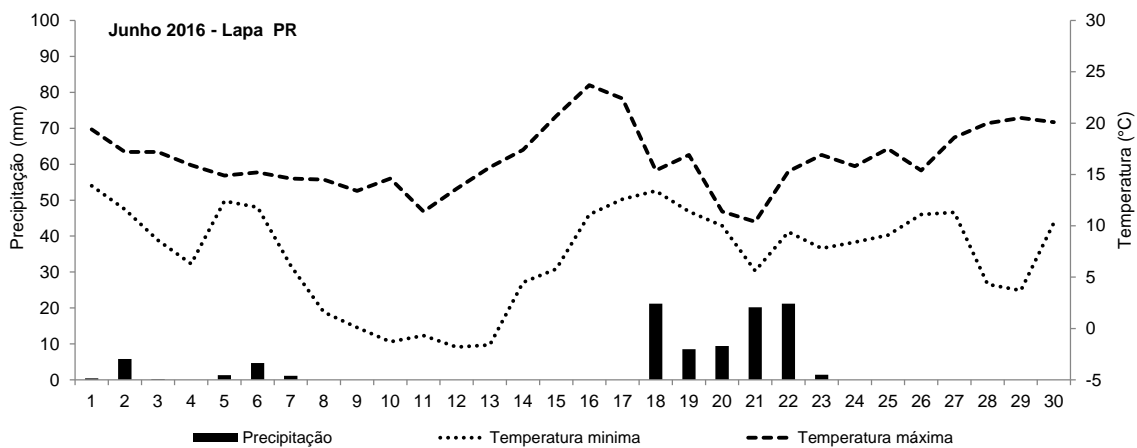
São necessários estudos futuros, visando o melhor entendimento em relação ao papel dos ascósporos na epidemia, bem como alternativas de controle mais eficientes a esse tipo de estrutura.

6 APÊNDICES

APÊNDICE A. PULVERIZAÇÕES REALIZADAS ENTRE JUNHO E SETEMBRO de 2016 NAS PROPRIEDADES DE CAMPO LARGO, PORTO AMAZONAS, PALMAS 01 E PALMAS 02.

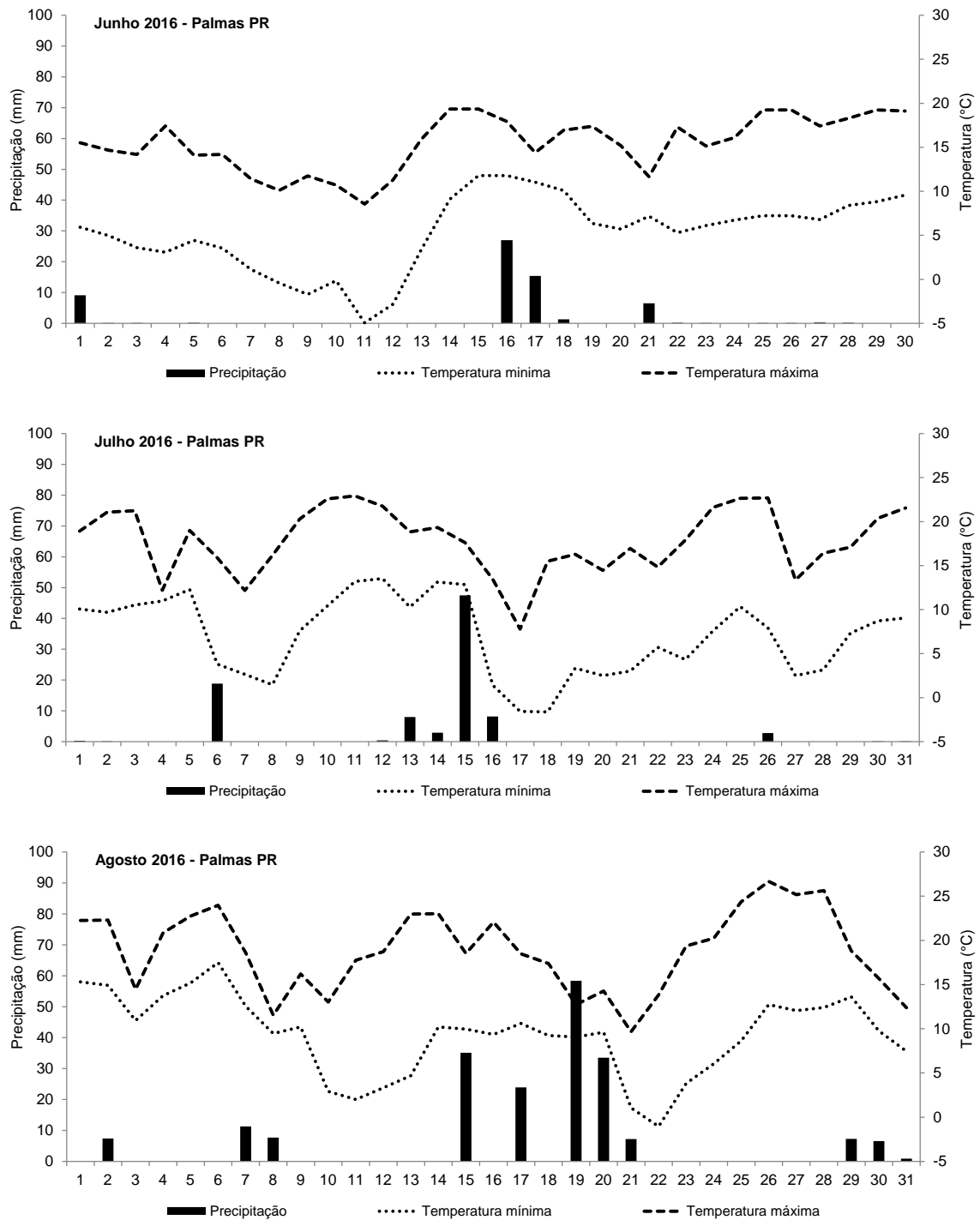
Nome comercial	Ingrediente Ativo	Grupo Químico	Campo Largo	Patógeno alvo
Campo Largo				
Cobre Atar	Óxido cuproso*	Inorgânico	<i>Colletotrichum</i> spp., <i>Entomosporium mespili</i> , <i>Monilinia fructicola</i> , <i>Venturia inaequalis</i>	
Eilect	Hidróxido de cobre	Inorgânico	<i>Venturia inaequalis</i>	
Dithane	Mancozebe	Ditiocarbamato	<i>Colletotrichum</i> spp., <i>Venturia inaequalis</i>	
Unix 750	Ciprodinil	Anilino pirimidina	<i>Venturia inaequalis</i>	
Prisma	Difenoconazol	Triazol	<i>Venturia inaequalis</i>	
Dormex	Cianamida Hidrogena	Carbimida	Não se aplica - Regulador de Crescimento	
Agefix	Óleo Mineral	Hidrocarboneto Alifático	Não se aplica - Adjuvante	
Porto Amazonas				
Bordasul	Sulfato de Cobre	Inorgânico	Vários	
Recop	Oxíoreto de Cobre	Inorgânico	<i>Colletotrichum</i> spp., <i>Venturia inaequalis</i>	
Prevnil	Clorotalonil	Isotoloniidila	<i>Colletotrichum</i> spp., <i>Venturia inaequalis</i>	
Manzate	Mancozebe**	Ditiocarbamato	<i>Colletotrichum</i> spp., <i>Venturia inaequalis</i>	
Prisma*	Difenoconazol	Triazol	<i>Venturia inaequalis</i>	
Metiltofan	Tiofanato metílico	Benzimidazol	<i>Neonectria ditissima</i> , <i>Podosphaera leucotricha</i> , <i>Venturia inaequalis</i>	
Flint	Trifloxistrobina	Estrobilurina	<i>Venturia inaequalis</i>	
Dormex	Cianamida Hidrogena	Carbimida	Não se aplica - Regulador de Crescimento	
Agefix	Óleo Mineral	Hidrocarboneto Alifático	Não se aplica - Adjuvante	
Palmas 01				
Cobre Atar	Óxido cuproso*	Inorgânico	Vários	
Dormex	Cianamida Hidrogena	Carbimida	Não se aplica - Regulador de Crescimento	
Assist	Óleo Mineral	Hidrocarboneto Alifático	Não se aplica - Adjuvante	
Palmas 02				
Cobre Atar	Óxido cuproso*	Inorgânico	Vários	
Topsin 700	Tiofanato metílico	Benzimidazol	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Colletotrichum</i> spp., <i>Monilinia fructicola</i> , <i>Neonectria ditissima</i> , <i>Podosphaera leucotricha</i> , <i>Venturia inaequalis</i>	
Captan 500	Captana	Dicarbóximida	<i>Elsinoe piri</i> , <i>Colletotrichum</i> spp., <i>Monilinia fructicola</i> , <i>Venturia inaequalis</i> , <i>Neonectria ditissima</i>	
Nativo	Tebuconazol	Triazol	<i>Venturia inaequalis</i>	
Dormex	Cianamida Hidrogena	Carbimida	Não se aplica - Regulador de Crescimento	
Assist	Óleo Mineral	Hidrocarboneto Alifático	Não se aplica - Adjuvante	
* Aplicado duas vezes				
** Aplicado quatro vezes				

APÊNDICE B. CARACTERIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CLIMÁTICAS DAS LOCALIDADES DE CAMPO LARGO-PR E PORTO AMAZONAS-PR OBTIDAS DA ESTAÇÃO METEOROLÓGICA DO IAPAR (INSTITUTO AGRÔNOMICO NO PARANÁ) LOCALIZADA NO MUNICÍPIO DA LAPA-PR, DOS MESES DE JUNHO, JULHO E AGOSTO DE 2016.



FONTE: Instituto Agrônômico no Paraná (IAPAR)

APÊNDICE C. CARACTERIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CLIMÁTICAS DAS LOCALIDADES DE PALMAS 01 E 02 OBTIDA NA ESTAÇÃO METEOROLÓGICA DE PALMAS-PR DO IAPAR (INSTITUTO AGRÔNOMICO NO PARANÁ), DOS MESES DE JUNHO, JULHO E AGOSTO DE 2016.



FONTE: Instituto Agrônômico no Paraná (IAPAR)

APÊNDICE D. SINTOMAS EM FRUTOS NO TESTE DE PATOGENICIDADE DE ISOLADOS DE *Neonectria ditissima*, *Colletotrichum* sp., *Botryosphaeria* sp., *Alternaria* sp. e *Fusarium* sp. DE RAMOS



A= Testemunha, B = *Neonectria ditissima*, C = *Colletotrichum* sp., D = *Fusarium* sp., E= *Botryosphaeria* sp., F= *Alternaria* sp.